

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie



**Využití moderních analytických metod  
v klinickém výzkumu**

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Ondřej Sobotka, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Mgr. Andrea Vernerová



„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Mgr. Andrea Vernerová



## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala mé školitelce doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vývoji chromatografických metod i při sepisování odborných publikací, ale také za velkou podporu, přátelský přístup, trpělivost a pomoc po celou dobu mého doktorského studia. Poděkování také patří mému odbornému konzultantovi MUDr. Ondřejovi Sobotkovi, Ph.D. z III. interní gerontometabolické kliniky Fakultní nemocnice (FN) Hradec Králové, který mi otevřel brány do světa buněčné fyziologie a rozšířil obzor i do jiných analytických metod než chromatografických. Oběma školitelům děkuji za zapojení do mnoha grantových a jiných projektů, a také za příležitost absolvovat zahraniční stáž a účastnit se prestižních mezinárodních vědeckých konferencí, díky čemuž jsem mohla získat bohaté zkušenosti. V neposlední řadě jim patří velký dík za pomoc, rady a motivaci při sepisování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat vedení FN Hradec Králové za možnost pracovat ve Výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové a podílet se tak na řešení výzkumných projektů. Velmi si vážím spolupráce s prof. MUDr. Bohuslavem Melicharem, Ph.D. z FN Olomouc, který mě přivedl k analýze ze slin a spolupracoval na většině mých vědeckých výstupů. Nesmírně si vážím spolupráce s kolegy ze Stomatologické kliniky FN Hradec Králové jmenovitě s doc. MUDr. Vladimírou Radochovou, Ph.D. a s MDDr. Ondřejem Heneberkem, kteří mi umožnili aplikovat vyvinuté chromatografické metody v klinickém výzkumu. Ráda bych touto cestou vyjádřila také poděkování MUDr. Vítu Řeháčkovi, Ph.D., MUDr. Milanu Košťálovi, Ph.D. a RNDr. Ondřeji Součkovi, Ph.D., za spolupráci při řešení interních projektů ve FN Hradec Králové.

Mé poděkování patří také celému kolektivu Katedry analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy a Výzkumné laboratoře Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové za příležitosti prezentovat své výsledky na konferencích a také za pedagogické zkušenosti. Zejména bych ráda poděkovala RNDr. Lence Javorské, Ph.D. a PharmDr. Kateřině Matoušové, Ph.D. za umožnění podílet se na řadě rutinních analýz, a také na řešení problematiky denního provozu

laboratoře a za podporu a ochotu poradit v každé situaci. Dále také Mgr. Dorotě Turoňové, PharmDr. Kristýně Mrštné a Filipovi Hátlemu za přátelské prostředí, které dokázali vytvořit v laboratoři i mimo ni. V neposlední řadě děkuji paní Ivetě Svobodové za její milý přístup a za rady a pomoc při práci v laboratoři.

Ráda bych také poděkovala prof. Erichovi Gnaigerovi za možnost stáže v Oroboros Instruments v Innsbrucku a také mému kolegovi MSc. Luizovi Felipovi Garcia-Souzovi, Ph.D. za pomoc a rady při práci s oxygrafem a také při sepisování vědecké publikace.

Tato disertační práce by nevznikla bez podpory Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 548). Poděkování patří grantovým projektům, které také finančně podporovaly nejen můj výzkum, ale také zahraniční stáž: AZV MZ ČR 18-03-00130, MH CZ-DRO (UHHK, 00179906) a AKTION Česká republika-Rakousko (spolupráce ve vědě a výzkumu).

Závěrem bych ráda vyjádřila velké poděkování mé rodině, blízkým a přátelům, kteří mi byli vždy obrovskou oporou a motivací po celou dobu studia.

**ABSTRAKT**

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Mgr. Andrea Vernerová

**Školitel:** doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

**Konzultant:** MUDr. Ondřej Sobotka, Ph.D.

**Název disertační práce:** Využití moderních analytických metod v klinickém výzkumu

Disertační práce, komponovaná jako soubor pěti publikací, se zabývá vývojem, optimalizací a validací chromatografických metod a extrakčních postupů pro stanovení časných biomarkerů aktivace imunitního systému (neopterinu, kynureninu a tryptofanu) ve slinách a gingivální tekutině u onkologických pacientů a pacientů s parodontálním onemocněním. Dále je v práci zkoumán potenciál využití Clarkova senzoru pro zjištění správné funkce trombocytů pomocí měření mitochondriální respirace a jeho aplikace v klinickém výzkumu. Práce vznikla na základě spolupráce s několika klinickými pracovišti FN Hradec Králové a Olomouc a Oroboros Instruments (Innsbruck, Rakousko).

V teoretické části práce jsou blíže popsány jednotlivé analyty, jejich klinický význam, využití biologické matrice a jejich úprava před analýzou. Dále jsou zde diskutovány separační metody a metody detekce, které byly použity v rámci této práce.

Vlastní experimentální práce je rozdělena do dvou částí. První část je věnována vývoji, optimalizaci a validaci HPLC metod a jejich následnému využití v aplikovaném výzkumu (Příloha 1–4). V chromatografické části jsou komentovány dvě publikované metody a jedna práce rešeršní. Vyvinuté metody jsou zaměřené na stanovení časných biomarkerů zánětu ve slinách a gingivální tekutině zahrnující jednoduchou úpravu vzorku využitelnou pro velké série vzorků s důrazem kladeným na neinvazivní odběr pro pacienta. Metody využívají spojení s vysoce citlivými typy detekce jako je hmotnostní spektrometrie, fluorescenční detekce a detektor s diodovým polem. Dále

je v této části komentována jedna biomedicínská práce zabývající se stanovením neopterinu v moči u pacienta s maligním melanomem, na které jsem během svého doktorského studia spolupracovala.

Druhá část popisuje stanovení mitochondriální respirace trombocytů pomocí polarografického senzoru kyslíku u zdravých dárců krve s využitím dvou odlišných separačních technik pro izolaci trombocytů (Příloha 5). Výsledkem je ucelená metodická publikace, jejíž poznatky mohou být využity pro další experimentální práce.



**ABSTRACT**

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

**Candidate:** Mgr. Andrea Vernerová

**Supervisor:** Assoc. Prof. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

**Advisor:** MUDr. Ondřej Sobotka, Ph.D.

**Title of Doctoral Thesis:** Application of modern analytical methods in clinical research

The dissertation thesis, composed as a compilation of five publications, is dealing with the development, optimization and validation of chromatographic methods and extraction procedures for the determination of early activation of the immune system biomarkers (neopterin, kynurenine, and tryptophan) in saliva and gingival crevicular fluid in oncological patients and patients with periodontal diseases. Furthermore, the potential of the use of Clark's sensor to determine the correct function of platelets by measuring mitochondrial respiration and its application in clinical research is under investigation. This work was based on cooperation with several clinical departments of the University Hospital Hradec Králové and Olomouc, and Oroboros Instruments (Innsbruck, Austria).

The theoretical part of the thesis is focused on detail description of the individual analytes, their clinical significance, used biological matrices and their preparation before the analysis. Methods of separation and detection, which were used in this work, are also discussed.

The experimental work is divided into two parts. The first part deals with development, optimization, and validation of HPLC methods and their subsequent use in applied research (Supplement 1–4). Two methods and review article are described in the chromatographic part of the work. Developed methods focused on determination of early biomarkers of inflammation in saliva and gingival crevicular fluid include a simple sample preparation suitable for large series

of samples with an emphasis on non-invasive sampling. The methods use connection with highly sensitive types of detection techniques such as mass spectrometry, fluorescence, and diode array detection. In the next section of this part biomedical article is discussed. Presented work deals with the determination of urinary neopterin in relation with oncological disease. I was involved in this study during my doctoral studies.

The second part describes the determination of mitochondrial platelet respiration in healthy blood donors using a polarographic oxygen sensor in combination with two different separation techniques for isolation of platelets (Supplement 5). The comprehensive methodological publication could be used for follow-up experimental works.

**OBSAH**

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	15
1. ÚVOD.....	17
2. CÍL PRÁCE .....	19
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	21
3.1 Vybrané biologické matrice a způsoby jejich odběru .....	21
3.1.1 Krev.....	21
3.1.1.1 Trombocyty .....	22
3.1.2 Moč.....	23
3.1.3 Sliny.....	24
3.1.3.1 Odběr slin .....	25
3.1.4 Gingivální tekutina .....	27
3.1.4.1 Odběr gingivální tekutiny.....	28
3.2 Cílové analyty .....	30
3.2.1 Biomarkery aktivace imunitního systému .....	30
3.2.1.1 Neopterin .....	30
3.2.1.2 Tryptofan a kynurenin.....	31
3.2.1.3 Stanovení neopterinu, tryptofanu a kynureninu – rešerše metod.....	33
3.2.2 Kreatinin.....	34
3.2.3 Kyselina močová .....	36
3.2.3.1 Klinický význam ve slinách .....	36
3.2.3.2 Stanovení kyseliny močové ve slinách – rešerše metod.....	41
3.2.4 Mitochondriální respirační systém .....	44
3.3 Vybrané metody úpravy vzorku před analýzou .....	46
3.3.1 Ředění .....	47

3.3.2 Filtrace.....	47
3.3.3 Centrifugace .....	48
3.3.4 Srážení proteinů .....	49
3.4 Chromatografické metody.....	50
3.4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	50
3.4.2 HPLC detektory .....	54
3.4.2.1 Spektrofotometrická detekce .....	55
3.4.2.2 Fluorescenční detekce.....	56
3.4.2.3 Hmotnostně spektrometrická detekce .....	57
3.5 Ostatní metody separace a detekce používané v této práci .....	59
3.5.1 Centrifugace .....	59
3.5.1.1 Diferenciální centrifugace .....	59
3.5.1.2 Centrifugace v hustotním gradientu .....	60
3.5.2 Aferéza .....	61
3.5.3 Amperometrie – Clarkův senzor .....	63
3.5.3.1 Respirometrie.....	65
3.5.3.2 Aplikace v biosenzorech .....	67
3.6 Validace bioanalytických metod .....	68
4. KOMENTÁŘE K EXPERIMENTÁLNÍM VÝSTUPŮM S DISERTAČNÍ PRACÍ SOUVISEJÍCÍCH.....	71
4.1 Rešeršní práce: Neinvazivní stanovení kyseliny močové ve slinách v diagnostice vážných onemocnění .....	71
4.2 Stanovení markerů aktivace imunitního systému a kyseliny močové ve slinách .....	73
4.2.1 Úvod a cíl práce.....	73
4.2.2 Výsledky a diskuze .....	74

---

4.2.2.1 Úprava vzorku před analýzou .....	74
4.2.2.2 Chromatografické podmínky .....	75
4.2.2.3 Validace metody .....	76
4.2.2.4 Aplikace metody .....	78
4.2.3 Shrnutí .....	79
4.3 UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení markerů aktivace imunitního systému v gingivální tekutině .....	81
4.3.1 Úvod a cíl práce .....	81
4.3.2 Výsledky a diskuze .....	82
4.3.2.1 Úprava vzorku před analýzou .....	82
4.3.2.2 Chromatografické podmínky .....	82
4.3.2.3 Validace metody .....	86
4.3.2.4 Aplikace metody .....	89
4.3.3 Shrnutí .....	90
4.4 Potenciální využití měření neopterinu ve vztahu k horečce u metastatického melanomu s cílenou kombinovanou terapií .....	93
4.5 Porovnání mitochondriální respirace trombocytů pomocí dvou izolačních technik: centrifugace v hustotním gradientu a diskontinuální aferézy .....	95
4.5.1 Úvod a cíl práce .....	95
4.5.2 Výsledky a diskuze .....	96
4.5.2.1 Izolace trombocytů .....	96
4.5.2.2 Mitochondriální respirometrie .....	97
4.5.2.3 Vyšetření aktivace trombocytů .....	101
4.5.3 Shrnutí .....	102
5. ZÁVĚR .....	103
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	105

7. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ .....	129
7.1 Výstupy s disertační prací související.....	129
7.2 Výstupy s disertační prací nesouvisející .....	130
8. PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ .....	133
8.1 Přednášky .....	133
8.2 Plakátová sdělení.....	135
8.3 Grantové projekty.....	136
8.4 Stáže.....	137
9. PŘÍLOHY .....	139
9.1 Příloha 1.....	139
9.2 Příloha 2.....	139
9.3 Příloha 3.....	139
9.4 Příloha 4.....	139
9.5 Příloha 5.....	140
9.6 Příloha 6.....	140
9.7 Příloha 7.....	140

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A (Acetylcoenzym A)
ADP	Adenosindifosfát (Adenosine Diphosphate)
AmAc	Octan amonný (Ammonium Acetate)
AmFo	Mravenčan amonný (Ammonium Formate)
Amper-ED	Amperometrická elektrochemická detekce (Amperometric Electrochemical Detection)
ATP	Adenosintrifosfát (Adenosine Triphosphate)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
Coulo-ED	Coulometrická elektrochemická detekce (Coulometric Electrochemical Detection)
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
ED	Elektrochemická detekce (Electrochemical Detection)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
ELISA	Enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
ETS	Elektronový transportní řetězec (Electron Transport System)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FLD	Fluorescenční detekce (Fluorescence Detection)
FN	Fakultní nemocnice (University Hospital)
GCF	Gingivální tekutina (Gingival Crevicular Fluid)
GTP	Guanosintrifosfát (Guanosine Triphosphate)
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HRR	Respirometrie s vysokou sensitivitou (High Resolution Respirometry)
ICH	Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)

IDO	Indolamin 2,3-dioxygenáza (Indolamine 2,3-Dioxygenase)
IMM	Vnitřní mitochondriální membrána (Inner Mitochondrial Membrane)
INF- $\gamma$	Interferon gamma (Interferon Gamma)
IS	Vnitřní standard (Internal Standard)
LC-MS	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Coupling of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry)
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid Liquid Extraction)
LLOQ	Dolní mez stanovitelnosti (Lower Limit of Quantification)
ME	Matricové efekty (Matrix Effects)
MRM	Monitorování více iontových reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
mtDNA	Mitochondriální deoxyribonukleová kyselina (Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid)
NADH	Nikotinamidadenin dinukleotid (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)
OMM	Vnější mitochondriální membrána (Outer Mitochondrial Membrane)
PP	Srážení bílkovin (Protein Precipitation)
RIA	Radioimunolýza (Radio Immuno Assay)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SPE	Extrakce na tuhou fázi (Solid Phase Extraction)
TDO	Tryptofan 2,3-dioxygenáza (Tryptophan 2,3-Dioxygenase)
UA	Kyselina močová (Uric Acid)
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialová oblast (Ultraviolet)
Vis	Viditelná oblast světla (Visible Light)



## 1. ÚVOD

Interpretace laboratorních výsledků je nedílnou součástí diagnostiky a následné efektivní léčby. Využití moderních technologií v klinickém výzkumu i rutinní laboratorní praxi je klíčové pro správné a včasné odhalení závažných onemocnění a monitoring jejich terapie. Snaha o implementaci nových postupů je často provázena mnoha komplikacemi jako jsou komplexní biologické matrice podléhající celé řadě biochemických a fyzikálních interakcí, správná příprava vzorků, stanovení stopových množství endogenních látek a komplikace při celkové validaci těchto procesů.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) má potenciál splňovat všechna kritéria pro vysoce selektivní, specifické a citlivé stanovení látek v biologických matricích v klinické praxi. Zapojení HPLC v klinickém výzkumu jako klíčové metody je dokumentováno neustále narůstající řadou publikačních výstupů ve vědeckých databázích. HPLC je často využívána jako součást jak základního, tak i aplikovaného výzkumu a v kombinaci s moderní detekční technikou je silným konkurentem rutinně využívaných imunochemických a enzymatických postupů.

Biosenzory jsou vysoce citlivá zařízení, která jsou schopná poskytovat specifickou kvantitativní nebo semikvantitativní analytickou informaci o dané látce, jsou dalším z moderních směrů v dnešní laboratorní diagnostice. Své uplatnění našly nejen v rutinním provozu, ale díky možnosti jejich miniaturizace, v běžném životě laické veřejnosti. Svou nezastupitelnou roli mají také v základním výzkumu. Nejběžněji takto využívaným se typem biosenzoru je amperometrický senzor Clarkova typu, který detekuje proud přímo úměrný koncentraci kyslíku v měřeném vzorku. Toho se využívá například v glukometrech pro stanovení glukózy u pacientů s diabetes mellitus. Zmíněný amperometrický senzor lze také využít například ve výzkumu k objasnění bioenergetických funkcí mitochondrií u různých typů buněk. Z lékařského hlediska jsou poruchy mitochondriálních funkcí příčinou širokého spektra genetických poruch, některých civilizačních chorob a jiných závažných onemocnění.

Pomocí funkční analýzy lze tedy studovat dopad poruch biosyntézy metabolitů na energetický metabolismus buňky, tkáně nebo organismu.

Využitím chromatografických metod a metod funkční analýzy je možné získat ucelený pohled na příčiny a následky jednotlivých onemocnění, jejichž studium může významně přispět k rozvoji nových léčebných směrů.

## 2. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem předkládané disertační práce byl vývoj, optimalizace a validace dvou nových chromatografických metod a metodiky pro stanovení biomarkerů aktivity imunitního systému (neopterin, kynurenin a tryptofan) a kyseliny močové ve slinách a gingivální tekutině a jejich aplikace v klinickém výzkumu. Dalším cílem bylo zavedení inovativního přístupu měření mitochondriální respirace ve Fakultní nemocnici (FN) Hradec Králové, který využívá detekčního mechanismu Clarkova senzoru pro sledování funkčnosti metabolismu trombocytů v lidském organismu.

Vývoj zmíněných chromatografických metod byl zaměřen na jednoduchost, rychlost a aplikovatelnost v rámci velkých sérií vzorků. Požadavky na vývoj nových metod vycházejí z FN Hradec Králové a FN Olomouc, kde také proběhl odběr biologického materiálu od pacientů a zdravých dárců. Všichni účastníci studií podepsali informovaný souhlas, který byl schválen etickou komisí.

Prvním cílem chromatografické části bylo vyvinout HPLC metodu ve spojení fluorescenční detekcí (FLD) a detekcí s diodovým polem (DAD) pro stanovení neopterinu, kynureninu, tryptofanu, kreatininu a kyseliny močové ve slinách. Nedílnou součástí vývoje této metody a metodiky byla též optimalizace odběru, extrakčního postupu, analýzy a následné testování stability. Všechny kroky byly realizovány ve spolupráci s Onkologickou klinikou FN Olomouc a Stomatologickou klinikou FN Hradec Králové. Dílčím, avšak důležitým cílem této části práce bylo sepsání rešerše zaměřené na stanovení kyseliny močové ve slinách pro diagnostiku závažných onemocnění, shrnutí dostupných poznatků o významu této látky v lidském organismu, metodách odběru vzorku slin, extrakčních technikách a analytických metodách pro její stanovení.

Druhým cílem chromatografické části bylo vyvinout a validovat rychlou a citlivou metodu pro stanovení neopterinu, kynureninu, tryptofanu a kreatininu v gingivální tekutině s využitím ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a FLD. Metoda byla vyvíjena ve spolupráci se

Stomatologickou klinikou FN Hradec Králové a aplikována na vzorky gingivální tekutiny odebrané od (i) pacientů s parodontálním onemocněním a (ii) zdravého souboru dárců.

Cílem druhé části experimentální práce bylo porovnat mitochondriální respiraci trombocytů izolovaných z krve od zdravých dárců pomocí dvou izolačních metod: centrifugace periferní krve v hustotním gradientu a aferetického odběru trombocytů na separátoru. Jedná se o inovativní studii, která ve svém zaměření propojuje běžnou klinickou diagnostiku (venepunkce, transfúze trombocytů) a čistě experimentální metodiky, využívající centrifugaci a detekci pomocí Clarkova senzoru (analýza mitochondriální respirace). Návrh k zavedení metodiky do souboru vyšetřovacích možností výzkumné laboratoře vzešel ze spolupráce s pracovištěm III. interní gerontometabolické kliniky FN Hradec Králové. Předkládaná experimentální práce je také založena na spolupráci s řadou odborníků z IV. interní hematologické kliniky, Transfúzního oddělení, Ústavu klinické imunologie a alergologie FN Hradec Králové a Oroboros Instruments (Innsbruck, Rakousko), která se rozvinula v rámci mé zahraniční spolupráce.

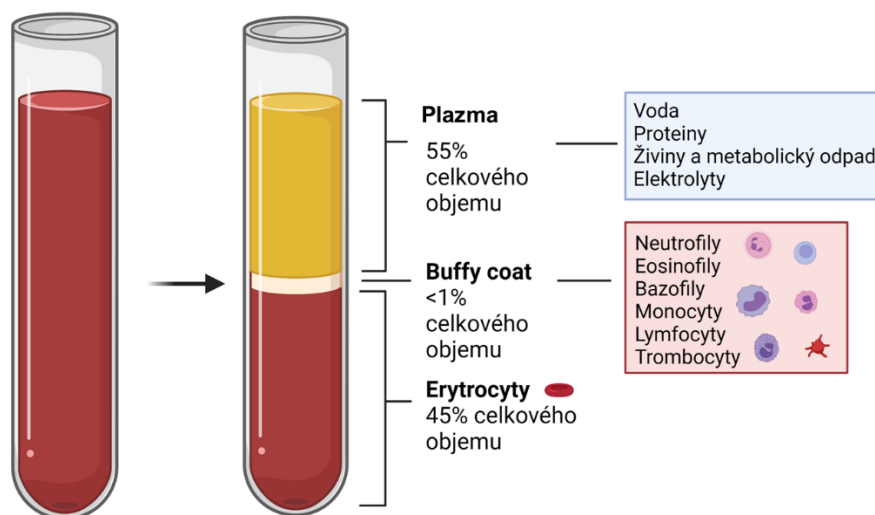
### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Vybrané biologické matrice a způsoby jejich odběru

##### 3.1.1 Krev

Krev je považována za nejběžněji využívaný biologický materiál pro vyšetření v rutinních laboratořích i ve výzkumu. Typy odběru se rozdělují na venózní, arteriální a kapilární. Odběr by měl být prováděn ideálně po 10 až 12 hodinách lačnění do zkumavek dle požadavku na vyšetření. Pro vyšetření se používá plná krev, plazma nebo sérum. V případě séra je krev odebírána do zkumavek bez antikoagulačních činidel. Před centrifugací je nutno krev nechat 20 minut samovolně srážet. Pro získání plazmy je nutné používat zkumavky s protisrážlivým činidlem jako je heparin, 3,8% citronan sodný,  $K_2EDTA$  nebo  $Na_2EDTA$ .

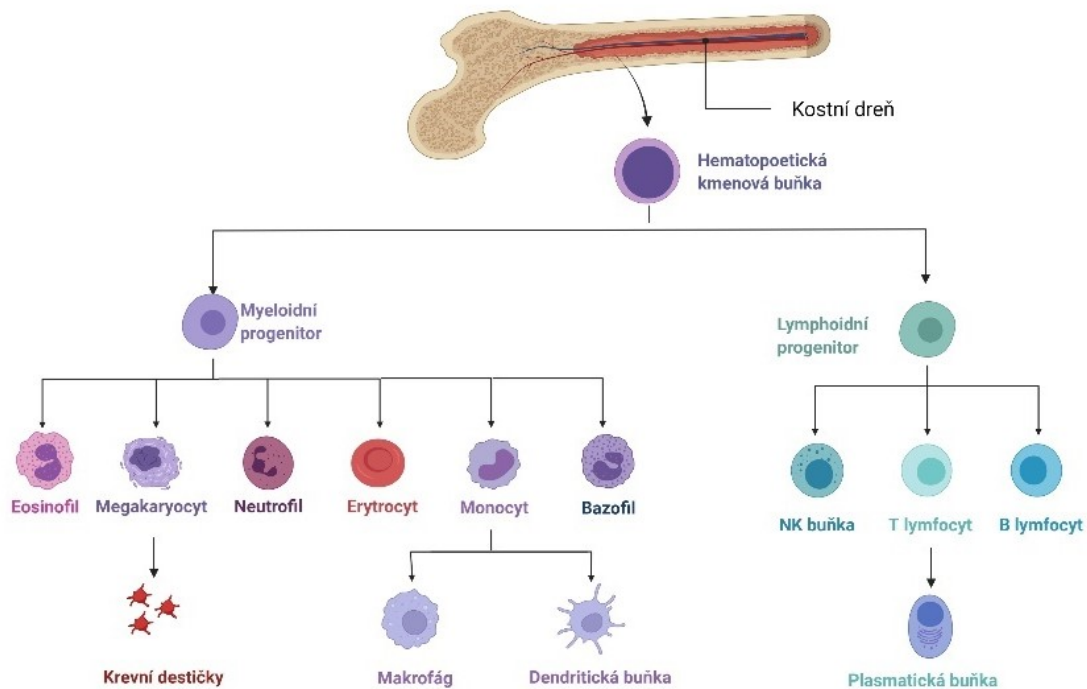
Během centrifugace plné krve dochází k oddělení krevních elementů (erytrocytů, leukocytů a trombocytů) od plazmy, přičemž nejnižše klesnou erytrocyty (Obr. 1). Centrifugace se nejběžněji provádí při relativní odstředivé síle (RCF) 1 000–1 500 × g po dobu 10 minut při pokojové teplotě [1, 2].



Obr. 1 Centrifugace plné nesrážlivé krve pro oddělení plazmy (převzato ze zdroje [3] a upraveno)

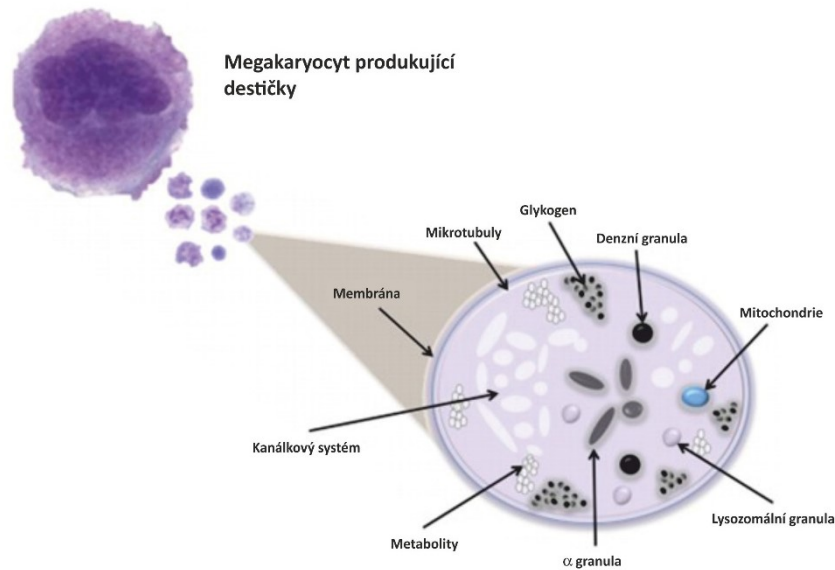
### 3.1.1.1 Trombocyty

Krevní destičky neboli trombocyty jsou 2–4  $\mu\text{m}$  velké bezjaderné elementy diskoidního tvaru, které mají nezastupitelnou roli v hemostáze. Trombocyty vznikají v kostní dřeni odštěpováním cytoplazmy megakaryocytů, které jsou tvořeny z pluripotentní kmenové buňky (Obr. 2). Dosahují životnosti 9–12 dní [4].



Obr. 2 Schématické znázornění diferenciace kmenových buněk kostní dřene (převzato ze zdroje [4] a upraveno)

Struktura trombocytu (Obr. 3) je tvořena plazmatickým obalem, jehož součástí je albumin, fibrinogen, koagulační a plazmatické látky (globuliny, glykoproteiny) a viskózní matrix. Dále trombocyty obsahují organely jako jsou denzní tělíska,  $\alpha$ -granula, lyzozomy, peroxizomy a mitochondrie [5].



Obr.3 Struktura trombocytu (převzato ze zdroje [6] a upraveno)

Fyziologická hladina trombocytů v krvi je v rozmezí  $150\text{--}400 \times 10^9/l$  [5]. Se zvýšenými počty trombocytů (trombocytózy) se nejčastěji setkáváme u esenciální trombocytémie, polycytémia vera, myeloproliferativních onemocnění, zánětů nebo po splenektomii. Naopak snížené počty trombocytů (trombocytopenie) mohou být nalezeny u poruch kostní dřeně, imunitních onemocnění, leukémie nebo při lékových intoxikacích [5, 6].

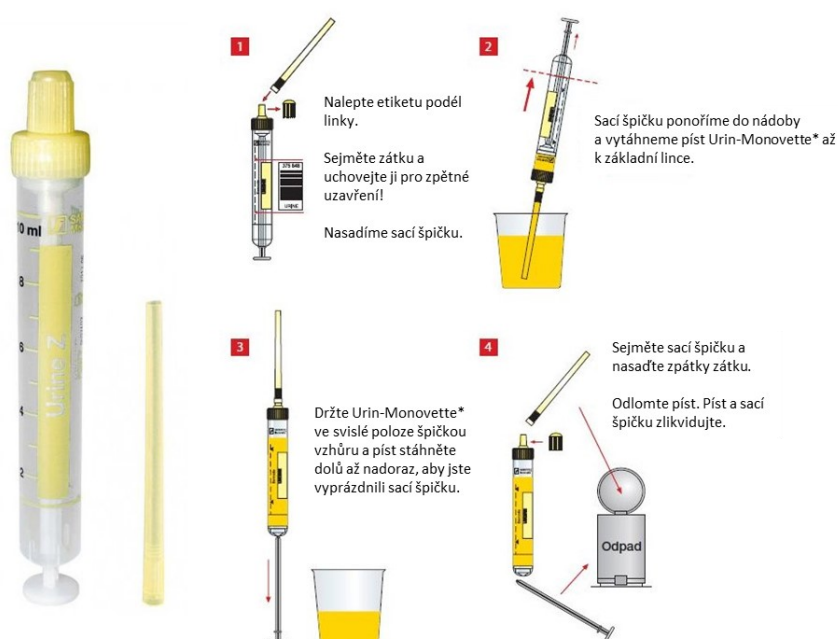
Trombocyty jsou metabolicky aktivní a využívají mitochondrie jako hlavní zdroj adenosintrifosfátu (ATP). Kromě energetické podpory, mitochondrie také hrají klíčovou roli v regulaci jeho aktivace, zejména jako zásobárna vápenatých iontů, čímž přispívají k udržování stálého vnitřního prostředí [7]. Během aktivace trombocytů dochází ke zvýšení oxidace substrátů (glukóza, glutamin a mastné kyseliny) a k udržení intracelulárních hladin ATP.

### 3.1.2 Moč

Moč vzniká filtrací krve v glomerulech ledvin. Prostřednictvím moči jsou vylučovány odpadní látky, aby byla zachována homeostáza v organismu. Jedná se o kapalinu nažloutlého zbarvení o pH 5–8. Hlavní složkou moči je voda, ve které jsou obsažené odpadní dusíkaté látky. Dále obsahuje rozpuštěné soli (chloridové, sodné a draselné

ionty), sacharidy, lipidy (mastné kyseliny, fosfolipidy, cholesterol a triglyceridy) a velmi malé množství bílkovin (<0,15 g/den) [1, 2, 8].

Produkce moči se mění během dne, v závislosti na příjmu a výdeji tekutin či konzumaci léků. Rozlišujeme tedy několik typů odebrané moči – první ranní moč, moč získaná v průběhu dne či moč sbíraná za určitý čas. Nejčastěji se využívá k vyšetření vzorek první ranní moči, a to z důvodu zakoncentrování vylučovaných látek během noci. Moč je odebírána do čistých, suchých a uzavíratelných sběrných nádob dle typu vyšetření (Obr. 4) [9].

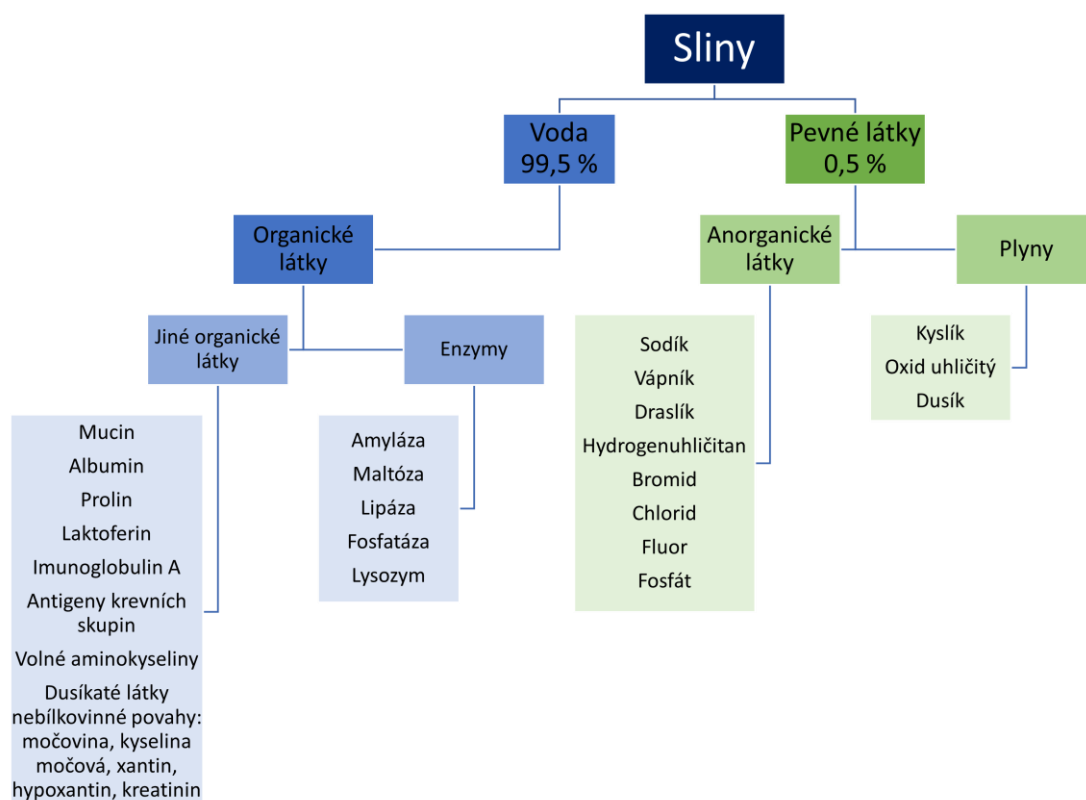


Obr. 4 Příklad systému Monovette (Sarstedt, Praha, Česká republika) pro odběr moči včetně postupu (převzato ze zdroje [9])

### 3.1.3 Sliny

Během posledních let získalo využití slin jako diagnostického materiálu značnou pozornost. Hlavními výhodami jsou neinvazivní metoda odběru, snížené riziko přenosu infekce na laboratorní personál při manipulaci se vzorkem a nákladově efektivnější přístup ke screeningu velkých populací než u odběru krve. Sliny jsou tvořeny ve slinných žlázách a mají nenahraditelné funkce pro lidský organismus jako je funkce trávicí, vylučovací a ochranná [2]. Lidské sliny se skládají zejména z vody a anorganických látek [10]. Podrobný přehled složení slin ukazuje Obr. 5.





Obr. 5 Složení slin

### 3.1.3.1 Odběr slin

Vzorky slin se obvykle odebírají ráno nalačno nebo nejdříve 30 minut po konzumaci jídla a pití, výplachu úst a kouření [11]. Doporučení se však může lišit podle pokynů výrobce odběrového zařízení či typu vyšetření.

Odběr slin může být rozdělen na dva základní přístupy: celkový odběr slin a odběr ze slinných žláz. Odběr slin přímo ze žlázy je ojedinělý, technicky velmi náročný s nízkým výtěžkem a vyžaduje provedení odborníkem. Oproti tomu odběr celkových slin je dnes hojně využíván a pomocí tohoto přístupu můžeme získat až 5 ml slin. Sliny se mohou odebírat dvěma způsoby v závislosti na typu odběrové soupravy, kterou zvolíme [12]. První z nich využívá k odběru pasivního slinění do předem určené nádoby. Jedná se o jednoduchou a pohodlnou techniku pro pacienty, kteří ji mohou vykonat i v domácím prostředí. Příkladem komerčně dostupného kitu je Saliva Collection Aid kit (Salimetrics, Carlsbad, USA), který se skládá ze sběrné nádoby

a nástavce. Po vložení nástavce do úst se nechají sliny pasivně stékat do vialky (Obr. 6) [13].



Obr. 6 Odběrový systém slin Saliva Collection Aid (Salimetrics, Carlsbad, USA) (převzato ze zdroje [13])

Druhým typem je stimulovaný odběr žvýkáním inertních materiálů jako je bavlněný váleček nebo polyesterová houba. Ke stimulaci slinění lze použít i kyselinu citrónovou, ta však snižuje pH vzorku, a tím může ovlivnit výsledky analýzy. Mezi nejběžněji používané odběrové soupravy patří komerčně dostupný Salivette systém (Sardstedt, Praha, Česká republika), který obsahuje zkumavku s vnitřní nádobou, do které se vkládá bavlněný váleček či tampón (Obr. 7). Při odběru je doporučeno bavlněný váleček žvýkat nebo vložit pod jazyk po dobu 5 minut. Po nasátí slin je váleček zpět vložen do vnitřního nástavce zkumavky. K získání slin zkumavku centrifugujeme při  $1000 \times g$  po dobu 2 minut a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mezi hlavní výhody tohoto typu odběru patří jednoduchost a nižší viskozita slin, než je tomu u pasivního slinění [10, 12, 14, 15].



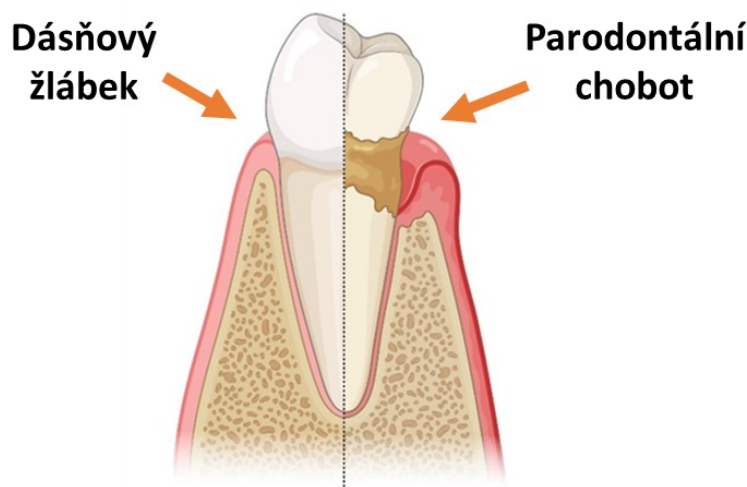
Obr. 7 Odběrový systém slin Salivette (Sardstedt, Praha, Česká republika)

### 3.1.4 Gingivální tekutina

Dásňový žlábek (sulcus gingivalis) představuje prohlubeň mezi okrajem dásně (gingivy) a povrchem zubu. Dno dásňového žlábků je tvořeno spojovacím epitelem, jež spolu s vazivovou tkání pod ním vytváří bariéru mezi nesterilním prostředím dutiny ústní a sterilním vnitřním prostředím organismu. Za parodontální chobot je považováno prohloubení dásňového žlábků, které může být způsobeno koronárním posunem okraje gingivy při zánětlivé reakci. Zánět gingivy je následně spojen s otokem, zvýšením permeability kapilár, ztenčením a degenerativními změnami epitelu stěny parodontálního chobotu, leukocytární infiltrací a destrukcí kolagenu. V případě parodontitidy dochází také k resorpci alveolární kosti a prohlubování parodontálního chobotu apikálním směrem [16].

Gingivální tekutina (GCF) je vylučována přes spojovací epitel do oblasti dásňového žlábků. Jedná se o transudát či exsudát krevní plasmy [17]. Obsah bílkovin a objem GCF kolísá v závislosti na stupni zánětu gingivy, tedy na permeabilitě kapilár a stupni poškození epitelu dásňového žlábků. Množství tekutiny je závislé na permeabilitě kapilár spojovacího epitelu. Při zdravém parodontu je její množství téměř nulové, GCF má charakter transudátu. Naopak se stupňujícím se zánětem se její množství zvyšuje a z dásňového žlábků vzniká parodontální chobot (Obr. 8). Nejdůležitějšími funkcemi GCF jsou její antimikrobiální a protizánětlivé účinky, dále zlepšuje adhezi epitelových buněk a čistí žlábek od nežádoucích látek.

GCF obsahuje, kromě komponent krevního séra, také látky tvořené přímo v dásňovém žlábků/parodontálním chobotu. Jedná se o produkty rozpadu tkání, mediátory zánětu a protilátky proti bakteriím zubního plaku. V GCF jsou dále přítomny buňky a jejich fragmenty, zejména se jedná o leukocyty, erytrocyty, epitelální a bakteriální buňky. GCF tedy obsahuje jak anorganické (sodné, draselné, vápenaté a fosfátové ionty), tak i organické látky (proteiny včetně enzymů, imunoglobuliny, polysacharidy) [18, 19]. Potenciál GCF jako diagnostické tekutiny poprvé zmínili Brill a Krasse již v roce 1988 [20]. Nejběžněji je odběr GCF indikován při sledování progresu onemocnění u pacientů s parodontálním onemocněním. Parodontální onemocnění představují skupinu bakteriálních infekčních onemocnění s přetrvávajícím zánětem, rozpadem pojivové tkáně a destrukcí alveolární kosti [21, 22]. V současné době je zlatým standardem pro diagnostiku parodontálních onemocnění klinické vyšetření, tedy hodnocení hloubky parodontálních chobotů, krvácivosti po sondáži, či gingivální index [23, 24].

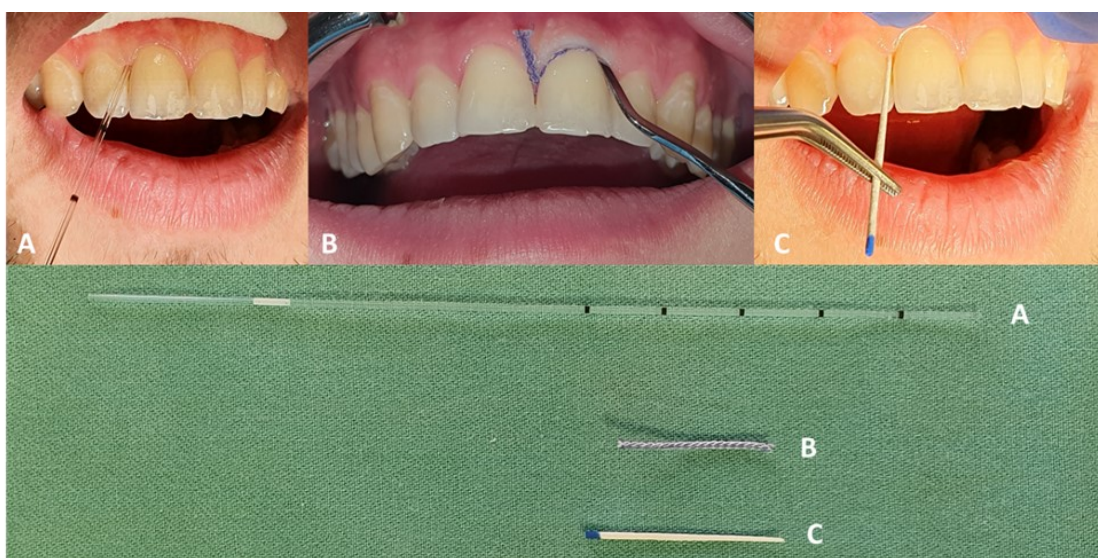


Obr. 8 Porovnání zdravé (vlevo) a postižené (vpravo) tkáně

#### 3.1.4.1 Odběr gingivální tekutiny

Odběr GCF můžeme rozdělit na intrasulkulární a extrasulkulární. Mezi intrasulkulární přístupy patří odběr pomocí retrakčního vlákna či papírového čepu. Během tohoto odběru se vlákno či čep jemně zavádí přímo do dásňového žlábků/parodontálního chobotu, kde se ponechá určitou dobu, aby dostatečně absorbovalo tekutinu a poté

se odebere do zvážené zkumavky. Extrasulkulární přístup je založen na výplachu dásňového žlábků/parodontálního chobotu a odběru pomocí mikrokapiláry, papírového čepu nebo absorpčních proužků filtračního papíru. V tomto případě se GCF odebírá z ústí dásňového žlábků/parodontálního chobotu [18, 25–27]. Vybrané metody odběru GCF jsou ukázány na Obr. 9. Nejběžněji se využívá odběr GCF pomocí proužků filtračního papíru. Po absorpci GCF se odebraný objem kvantifikuje pomocí přístroje Periotron (Oraflow Inc., Smithtown, NY, USA), který detekuje vlhkost filtračních proužků, a tím dokáže kvantifikovat odebrané množství tekutiny. Odběr pomocí mikrokapiláry lze snadno kvantifikovat díky komerčně dostupným kalibrovaným kapilárám o různých objemech, avšak transport a s ním spojená možnost odpaření GCF řadí tuto techniku do méně využívaných metod odběru. Stejně tomu je u výplachu žlábků/chobotu, kde je velmi obtížné určit přesný faktor ředění a finální objem odebrané tekutiny [27].



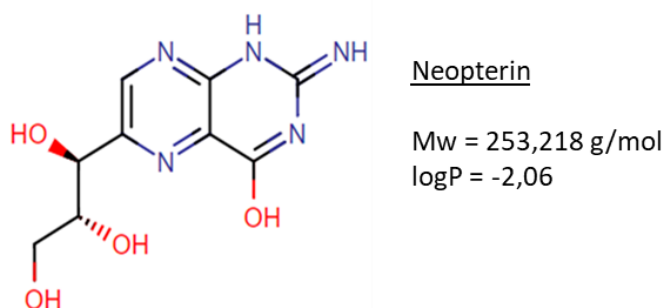
Obr. 9 Ukázka typů GCF odběru. (A) Odběr pomocí mikrokapiláry, (B) odběr pomocí předváženého retrakčního vlákna a (C) odběr pomocí papírového čepu

## 3.2 Cílové analyty

### 3.2.1 Biomarkery aktivace imunitního systému

#### 3.2.1.1 Neopterin

Neopterin (D-erythro-1,2',3'-trihydroxypropylpterin) (Obr. 10) se řadí do skupiny pteridinů. Pteridiny jsou aromatické chemické sloučeniny složené z kondenzovaných pyrimidinových a pyrazinových kruhů. Jedná se o nízkomolekulární látku, jejíž množství se zvyšuje při imunitní reakci v organismu [28].

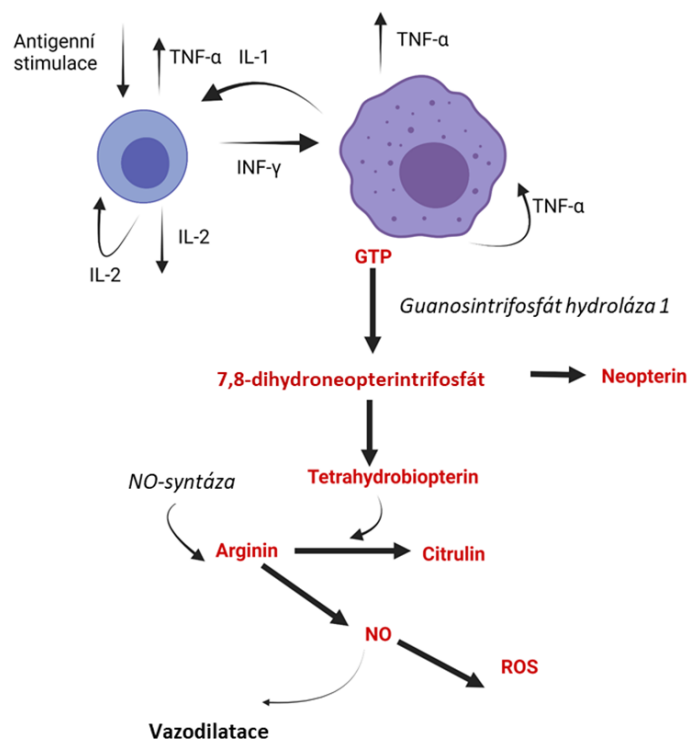


Obr. 10 Struktura neopterinu

Neopterin je tvořen především v makrofázích pocházejících z monocytů a dendritických buněk jako odpověď na produkci interferonu gamma (INF- $\gamma$ ), který se vylučuje z aktivovaných Th1 lymfocytů. Uvolňování probíhá zpravidla na počátku imunologické odpovědi a je také spojeno s antimikrobiální a antivirovou aktivací imunitního systému. Vyšší hladiny INF- $\gamma$  následně vedou k aktivaci guanosintrifosfát (GTP)-cyklohydrolázy, a tím ke stimulaci syntézy neopterinu z GTP. Během prvního kroku jeho syntézy vzniká 7,8-dihydroneopterin trifosfát, který může být využit pro syntézu neopterinu nebo tetrahydrobiopterinu (Obr. 11) [28].

Neopterin lze detekovat v různých tělesných tekutinách, jako je sérum, mozkomíšní mok, synoviální tekutina, pankreatická šťáva, moč, sliny nebo ascitická tekutina [24, 28–31]. Hladina neopterinu v tělních tekutinách je zvýšena u infekcí, autoimunitních a maligních onemocnění, rejekce aloimplantátu nebo také u selhání

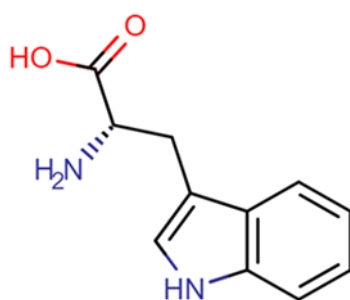
srdce a ledvin [32]. Jedná se o citlivý biomarker, jelikož jeho reakce na imunitní podnět je dřívější, než je tomu u běžně používaných markerů [33].



Obr. 11 Mechanismus aktivace imunitního systému s následnou syntézou neopterinu. TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizující faktor alfa; IL-1 – interleukin 1; IL-2 – interleukin 2; INF- $\gamma$  – interferon gamma; GTP – guanosintrifosfát; NO – oxid dusnatý; ROS – reaktivní formy kyslíku

### 3.2.1.2 Tryptofan a kynurenin

Tryptofan je esenciální nepolární aromatická aminokyselina. Kynurenin vzniká jako produkt katabolismu tryptofanu (Obr. 12 a 13).

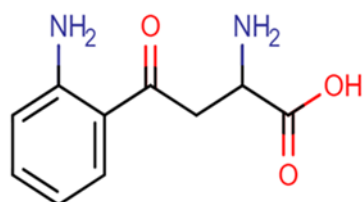


Tryptofan

Mw = 204,229 g/mol  
logP = -1,09

Obr. 12 Struktura tryptofanu



Kynurenin

Mw = 208,217 g/mol

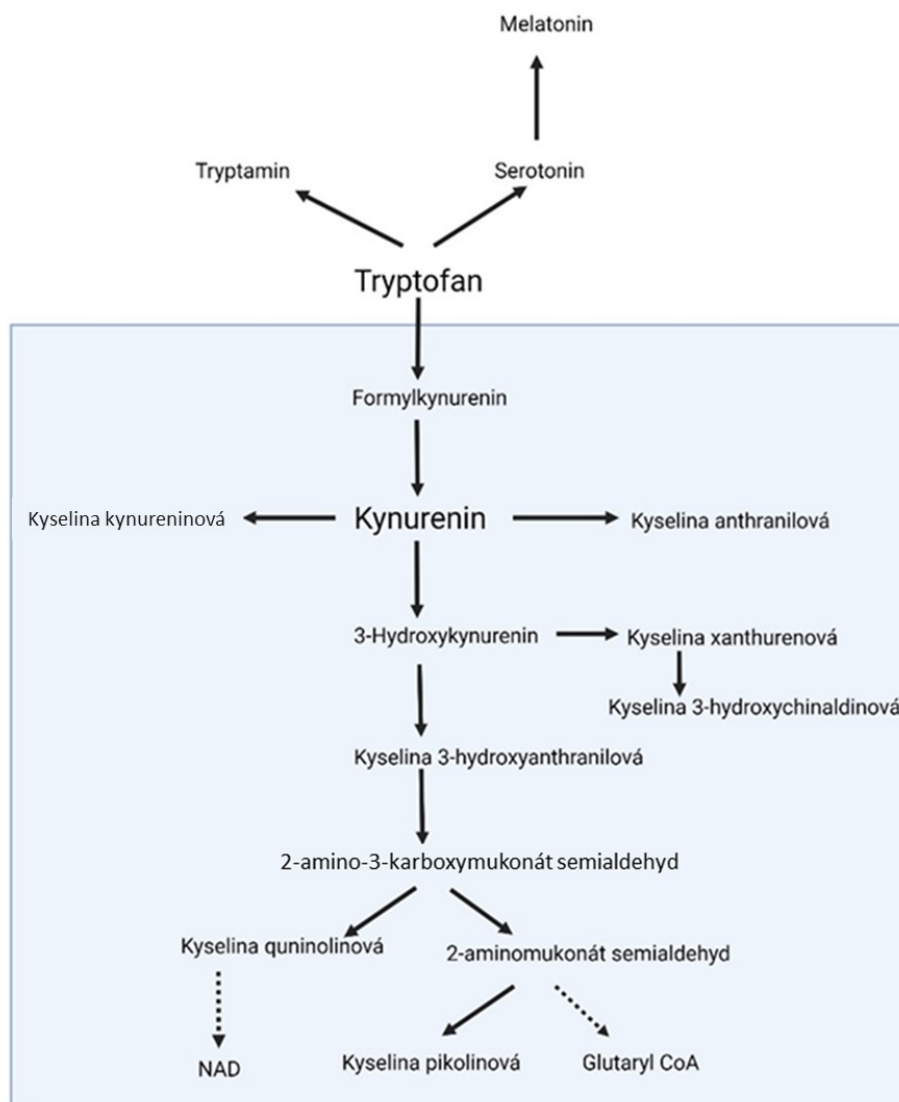
logP = -1,91

Obr. 13 Struktura kynureninu

Tryptofan je také součástí biosyntézy serotoninu a melatoninu (Obr. 14). Většina přijatého tryptofanu je odbouráváno přes takzvanou kynureninovou metabolickou cestu, která je iniciována enzymy tryptofan 2,3-dioxygenázou (TDO) a indolamin 2,3-dioxygenázou (IDO). TDO se nachází v jaterních buňkách, zatímco IDO je exprimován v různých buňkách včetně makrofágů a dendritických buněk pocházejících z monocytů. Díky těmto enzymům dochází k počáteční přeměně tryptofanu na formylkynurenin, který je dále rozložen na kynurenin. IDO je přednostně indukována cytokinovým INF- $\gamma$  a její aktivita je nejlépe charakterizována poměrem kynurenin/tryptofan, který často koreluje s hladinami markerů aktivace imunitního systému, jako je neopterin [34].

U infekčních, autoimunitních, maligních onemocnění a poruchách, které zahrnují imunitní aktivaci buněk (typu Th1) je pozorována nízká hladina tryptofanu v séru a plazmě. Z toho vyplývá, že ve stavech přetrvávající imunitní aktivace může nízká hladina tryptofanu přispívat k imunodeficienci. Snížený sérový tryptofan může také ovlivňovat biosyntézu serotoninu a vést k depresivním stavům [35–37].





Obr. 14 Katabolismus tryptofanu a vznik kynureninu a jeho derivátů. CoA – koenzym A; NAD – nikotinamidadenindinukleotid

### 3.2.1.3 Stanovení neopterinu, tryptofanu a kynureninu – rešerše metod

V řadě klinických studií patří mezi nejčastěji používané metody pro stanovení neopterinu, tryptofanu a kynureninu imunologické metody zejména ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay-enzymová imunoanalýza) a RIA (Radio Immuno Assay-radioimunolýza), a to díky jejich jednoduchému provedení. RIA metody jsou založené na imunochemické reakci antigenu se specifickou protilátkou, v přítomnosti vhodné radioaktivně značené látky, která umožňuje kvantifikaci. Běžněji jsou využívány komerčně dostupné ELISA metody. Jejich principem je vznik imunokomplexu v přítomnosti enzymem značených protilátek nebo antigenů.

Následuje spektrofotometrická enzymová detekce (změna zbarvení) po přidání chromogenních substrátů. Ačkoli mají tyto metody své výhody zejména v jednoduchosti provedení a komerční dostupnosti, mají i své nevýhody. Mezi nedostatky patří falešná pozitivita či negativita výsledků způsobená zkříženými reakcemi, vysoká cena stanovení (kit pro jeden analyt a provedení v dubletu) a omezená doba expirace kitů. Chromatografické metody jsou v tomto případě považovány za standardní a referenční metodu [38]. Jedna z prvních prací o chromatografickém stanovení neopterinu byla sepsána Hausenem a kol. již v roce 1982 [39]. Ve většině případů chromatografického stanovení těchto analytů se jedná o separace, které využívají reverzní stacionární fáze typu C18 s plně porézními částicemi nebo monolitickými sorbenty [29, 40]. Pro stanovení neopterinu bylo také využito separace pomocí hybridní stacionární fáze (BEH-amid) v módu hydrofilně interakční chromatografie (HILIC) [41, 42].

Jako mobilní fáze se převážně využívají pufrů o různé koncentraci a pH v kombinaci s organickým rozpouštědlem (acetonitril, methanol). V případě detekce pomocí hmotnostní spektrometrie bývá mobilní fáze tvořena acetonitrilem či methanolem a vodou s upraveným pH. Neopterin je typicky detekován pomocí FLD při excitační vlnové délce 353 nm a emisní vlnové délce 438 nm. Pro detekci tryptofanu a kynureninu se nejběžněji využívá FLD, detekce v ultrafialové nebo viditelné oblasti světla (UV/Vis) případně DAD a MS. Tryptofan poskytuje fluorescenci při excitační vlnové délce 254 nm a emisní vlnové délce 404 nm. Kynurenin je stanovován v UV/Vis oblasti při 230 nm a 360 nm [29, 40, 42–48]. Extrakce analytů je nejběžněji založená na jednoduchém principu na bázi ředění a odstranění proteinů. Některé práce také využívají extrakci na tuhou fázi (SPE, Solid Phase Extraction) [43, 47, 49, 50].

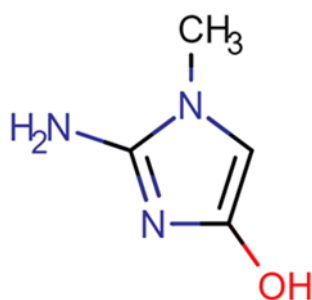
### 3.2.2 Kreatinin

Kreatinin je cyklický imid kreatinu s dobrou rozpustností ve vodě (Obr. 15). Vzniká jako odpadní produkt kreatinu ve svalové tkáni, kde je také současně největší zásobárna kreatinu v lidském těle. Po uvolnění kreatininu ze svalové tkáně do cirkulace následně vstupuje do ledvin a poté do moče. Koncentrace kreatininu

v moči je konstantní v průběhu celého dne a využívá se ke korekci diurézy, která je významným faktorem pro interpretaci laboratorních výsledků při stanovení látek v moči [40].

Kreatinin je nejčastěji používán jako biomarker renálních funkcí. U renálních poškození dochází ke zhoršení schopnosti ledvin filtrovat moč a hladiny kreatininu se zvyšují. Funkci ledvin lze vyhodnotit několika parametry, např. výpočet tubulární resorpce, glomerulární filtrace, frakční exkrece nebo clearance kreatininu [51, 52].

Kreatinin se nejběžněji stanovuje enzymatickou a Jaffého metodou. Principem Jaffého metody je reakce kreatininu a kyseliny pikrové v alkalickém prostředí za vzniku komplexu o výrazně žluté barvě. Intenzita zabarvení se měří fotometricky. Jedná se o metodu jednoduchou a levnou, ale s nízkou specifitou a velkou pravděpodobností vydávání falešně pozitivních či negativních výsledků díky interferujícím látkám (např. bilirubin, ketolátky, glukóza atd.). Druhým typem stanovení jsou enzymatické metody, které jsou více specifické, avšak také finančně náročnější. Dochází k přeměně kreatininu na kreatin pomocí enzymu kreatininázy. Třetí možností stanovení je využití chromatografických metod ve spojení s UV/Vis detekcí nebo MS [2, 53–55]. Kreatinin je nejběžněji detekován v UV oblasti při 235 nm [40]. V porovnání s výše popsanými metodami, chromatografické stanovení umožňuje současné stanovení kreatininu s dalšími cílovými analyty v jedné analýze včetně separace dalších interferujících látek ve vzorku [54].



Kreatinin

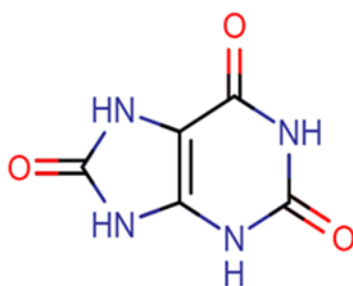
Mw = 113,12 g/mol

logP = 0,22

Obr. 15 Struktura kreatininu

### 3.2.3 Kyselina močová

Kyselina močová (2,6,8-trihydroxypurin, UA) (Obr. 16) je konečným produktem metabolismu purinových nukleotidů v lidském organismu. UA se tvoří z xanthinu a hypoxanthinu pomocí xanthinoxidoreduktázy a je z těla vylučována močí. UA je sloučenina špatně rozpustná ve vodě. V moči při pH nižším než 5,5 se vyskytuje v nedisociované formě a může vytvářet krystalky. S rostoucí hodnotou pH a teplotou se její rozpustnost zvyšuje. V krvi při pH = 7,74 je přítomna především v ionizované formě a se sodnými a draselnými ionty vytváří uráty, které jsou ve vodném roztoku rozpustnější. Velké množství UA (90 %) se v ledvinách zpětně vstřebává do krve, kde se podílí na antioxidační ochraně organismu a může být indikátorem oxidačního stresu [49, 56–58].



Kyselina močová

Mw = 168,112 g/mol

logP = -1,54

Obr. 16 Struktura kyseliny močové

#### 3.2.3.1 Klinický význam ve slinách

Kyselina močová je důležitým klinickým markerem pro mnoho onemocnění. Při nadbytečné akumulaci UA v krvi dochází ke tvorbě krystalů urátu sodného v kloubech, synoviální tekutině a jiných tkáních, a to vede k zánětlivé artritidě známé jako onemocnění dna. Vysoké hladiny UA v krvi (hyperurikémie) jsou také spojeny s onemocněním ledvin, leukémií, Lesch-Nyanovým syndromem nebo kardiovaskulárními nemocemi. Zvýšené hladiny UA můžeme také nalézt v organismu při diabetes mellitus, zvýšené hladině cholesterolu, vysokém tlaku, obezitě nebo při zvýšené konzumaci alkoholu. UA se nejběžněji stanovuje v krvi a moči, avšak stanovení ve slinách poskytuje neinvazivní alternativu. Již několik studií

ukázalo, že existuje velmi dobrá korelace mezi plazmatickými hladinami UA a těmi slinnými [58–63].

Podrobný přehled klinických aplikací stanovení UA ve slinách je uveden v Tab. 1, která shrnuje nalezené koncentrace UA ve slinách u pacientů a zdravých dárců, metody odběru a úpravy vzorku a použité analytické metody pro stanovení. Rozsáhlejší diskuze klinických aplikací je také sepsána v rešerši Vernerová a kol., která je součástí předkládané disertační práce (Příloha 1).

Tabulka 1 Přehled vybraných metod s různými koncentračními hladinami UA ve slinách u různých klinických aplikací

Odběr vzorku	Úprava vzorku před analýzou	Metoda	Typ onemocnění	Průměrná koncentrace (zdravý dárce) $\mu\text{mol/l}$	Průměrná koncentrace (pacient) $\mu\text{mol/l}$	Ref.
pasivní slinění	srážení proteinů	HPLC-DAD	chronická dnová artritida		513,0	[58]
stimulovaná slina žvýkáním polyesterového válečku	extrakce na tuhou fázi	HPLC-UV, Ampero-ED a Coulo-ED		137,5 (ED)		[49]
pasivní slinění	ředění a filtrace	HPLC-MS		136,8		[64]
pasivní slinění	ředění a filtrace	HPLC-Ampero-ED		234,5		[65]
pasivní slinění	srážení proteinů, filtrace pomocí centrifugačních filtrů Ultrafree	HPLC-MS/MS		46,8		[66]
pasivní slinění	ředění, odstranění proteinů, filtrace	HPLC-UV		115,0		[67]
pasivní slinění	ředění a filtrace	CE-Ampero-ED	onemocnění ledvin	92,2	272,0	[64]

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie; CE – kapilární elektroforéza; CZE – kapilární zónová elektroforéza; CIE – kapilární iontová elektroforéza; DAD – detektor s diodovým polem; UV – detekce v ultrafialové oblasti; Ampero-ED – amperometrická elektrochemická detekce; Coulo-ED – coulometrická elektrochemická detekce; MS – hmotnostní spektrometrie; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

Tabulka 1 (pokračování) Přehled vybraných metod s různými koncentračními hladinami UA ve slinách u různých klinických aplikací

Odběr vzorku	Úprava vzorku před analýzou	Metoda	Typ onemocnění	Průměrná koncentrace (zdravý dárce) $\mu\text{mol/l}$	Průměrná koncentrace (pacient) $\mu\text{mol/l}$	Ref.
Salivette systém	ředění a filtrace	CZE-UV		65,4		[68]
pasivní slinění	filtrace	CIE-UV		78,1		[69]
pasivní slinění	ředění a filtrace	miniaturizovaná CE-Ampero-ED	dna	52,9	850,6	[70]
pasivní slinění	ředění a filtrace	CE-Ampero-ED	dna	70,0	411,0	[71]
pasivní slinění	centrifugace	Uric Acid Liquicolor Plus Assay Kit	rakovina dutiny ústní	240,0	250,0	[72]
pasivní slinění		Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit	diabetes mellitus I. a II. typu	443,3	438,6 614,2	[73]
pasivní slinění	centrifugace	Uric Acid Analysis Kit, kolorimetrie (Cobas Mira autoanalyzátor)	lichen planus dutiny ústní	124,9	285,5	[74]

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie; CE – kapilární elektroforéza; CZE – kapilární zónová elektroforéza; CIE – kapilární iontová elektroforéza; DAD – detektor s diodovým polem; UV – detekce v ultrafialové oblasti; Ampero-ED – amperometrická elektrochemická detekce; Coulo-ED – coulometrická elektrochemická detekce; MS – hmotnostní spektrometrie; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

Tabulka 1 (pokračování) Přehled vybraných metod s různými koncentračními hladinami UA ve slinách u různých klinických aplikací

Odběr vzorku	Úprava vzorku před analýzou	Metoda	Typ onemocnění	Průměrná koncentrace (zdravý dárce) $\mu\text{mol/l}$	Průměrná koncentrace (pacient) $\mu\text{mol/l}$	Ref.
pasivní slinění	centrifugace	Infinite Uric Acid Liquid Kit	diabetes mellitus II. typu	112,4	185,6	[75]
pasivní slinění	centrifugace	Uric Acid (Liquid) Reagent Set	metabolický syndrom	184,9	278,1	[76]
stimulovaná slina žvýkáním bavlněného válečku	centrifugace	urikázo-peroxidázová metoda	hyperurikémie	175,5	378,3	[61]
pasivní slinění		Salivary Uric Acid Enzymatic Assay Kit		179,0		[62]
Salivette systém	centrifugace	enzymatická metoda	nefropatie	261,0	258,0	[62]
pasivní slinění	centrifugace	enzymatická metoda	ženy s preeklamsií	93,4	101,1	[57]
pasivní slinění	centrifugace	enzymatická metoda	diabetes mellitus II. typu	358,3	461,2	[77]

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie; CE – kapilární elektroforéza; CZE – kapilární zónová elektroforéza; CIE – kapilární iontová elektroforéza; DAD – detektor s diodovým polem; UV – detekce v ultrafialové oblasti; Ampero-ED – amperometrická elektrochemická detekce; Coulo-ED – coulometrická elektrochemická detekce; MS – hmotnostní spektrometrie; MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie



### 3.2.3.2 Stanovení kyseliny močové ve slinách – rešerše metod

Pro stanovení UA v biologických matricích se využívá řada analytických metod. Enzymatické metody, které se nejčastěji využívají v klinických laboratořích jsou založené na katalytické oxidaci UA na alantoin a peroxid vodíku v přítomnosti enzymu urát oxidázy nebo urikázy. Stanovení je poté prováděno kolorimetricky. Lze také stanovit vzniklý peroxid vodíku za katalýzy enzymem peroxidázou. Tyto metody jsou však dodávány s krátkou dobou expirace chemikálií a vyžadují velké množství (stovky  $\mu\text{l}$ ) vzorku pro analýzu pouze jednoho analytu [61, 62]. Dalšími používanými metodami jsou kapilární elektroforéza (CE) a HPLC. Hlavní výhodou těchto metod je, že umožňují selektivní a citlivé stanovení UA společně s dalšími cílovými analyty v průběhu jedné analýzy. Pro detekci UA pomocí CE jsou používány fotometrické (UV) detektory [68, 69]. Dále se také využívá elektrochemické detekce (ED) [64, 71]. Výhodou CE metod je kratší doba analýzy bez složité úpravy vzorku před analýzou a malá spotřeba vzorku, rozpouštědel a pufrů než u HPLC metod. Avšak optimalizace CE metod je velmi náročná zejména s ohledem na robustnost a citlivost stanovení. Z těchto důvodů je HPLC nejpoužívanější analytická metoda pro stanovení UA společně s dalšími zvolenými analyty v séru a v moči, ale také i ve slinách. Nejběžněji je HPLC spojena s ED, UV detekcí nebo ve spojení s MS. Stanovení UA ve slinách jsou nejčastěji prováděny v reverzním módu se stacionární fází C18 [49, 61, 65, 67]. Jako mobilní fáze se nejběžněji používá fosfátový pufr s upraveným pH za použití kyseliny trichloroctové a citrátu sodného v kombinaci s methanolem v izokratické eluci [49, 61, 64, 65], ale také v gradientu [66]. Inoue a kol. ve své studii porovnávají různé detekční techniky spojené s HPLC zejména z pohledu citlivosti pro stanovení UA ve slinách. V této práci jsou porovnávány tři typy detekce: UV detekce, amperometrická ED (Ampero-ED) a coulometrická ED (Coulo-ED). Separace byla prováděna na C18 koloně ( $150 \times 2,0 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) s fosfátovým pufrem ( $74 \text{ mmol/l}$ , pH 3,0) jako mobilní fází, v izokratické eluci, s průtokem  $0,2 \text{ ml/min}$ , s objemem nástřiku  $20 \mu\text{l}$  a celkovou dobou analýzy 10 minut. Při porovnání limitů detekce se ukázala Ampero-ED pro stanovení UA ve slinách jako nejcitlivější typ detekce s vysokou selektivitou [49]. Obecné principy spojení HPLC s ED pro stanovení UA byly přehledně popsány v knize „Electrochemical Detection in HPLC: Analysis of Drugs

and Poisons“ [78]. Přehled chromatografických metod ukazuje Tab. 2, která kromě chromatografických podmínek separace zahrnuje také metody odběru a úpravy vzorku.

Mezi další techniky stanovení slinných hladin UA patří také enzymatická kolorimetrická analýza a využití biosenzorů. Zejména vývoj biosenzorů zaznamenal v současné době pokrok. Jedná se o citlivá analytická zařízení, která jsou schopna převést fyzikální nebo chemický signál na jiný, lépe měřitelný, jehož rozpoznávací část tvoří biologický materiál. Biosenzory jsou tvořeny bioreceptorem (enzymy, protilátky, mikroorganismy atd.), převodníkem, detektorem a záznamovým zařízením. V případě stanovení UA se nejvíce používají elektrochemické biosenzory [79, 80].

Podrobnější přehled všech metod a principů stanovení UA ve slinách je popsán v rešerši Vernerová a kol., která je součástí předkládané disertační práce (Příloha 1).

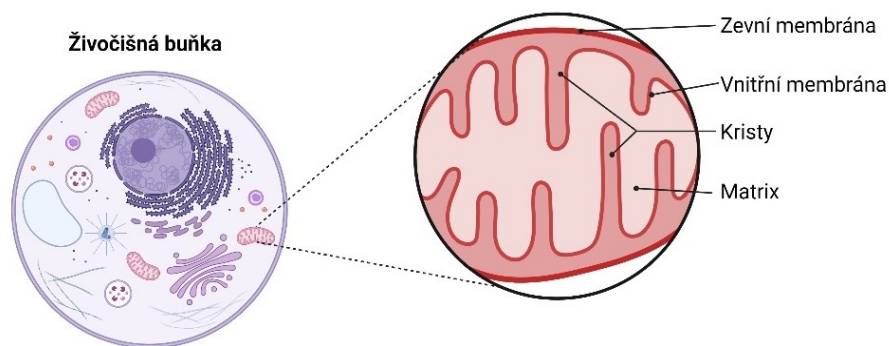
Tabulka 2 Přehled chromatografických metod pro stanovení UA ve slinách

Úprava vzorku před analýzou	Stacionární fáze	Mobilní fáze, průtok	Detektor	Nástřik μl	Čas min	LOQ μmol/l	Ref.
odstranění proteinů	Agilent ZORBAX SB-C18 (100 × 3,0 mm, 3,5 μm)	20 mmol/l acetát sodný, 30 mmol/l kyselina octová a 1 % methanol, 0,4 ml/min	DAD	5	4	0,13	[58]
extrakce na tuhou fázi (SPE)	CAPCELL PAK C18 UG 120 (150 × 2,0 mm, 5 μm)	fosfátový pufr (74 mmol/l, pH 3,0), 0,2 ml/min	UV	20	10	0,60	[49]
extrakce na tuhou fázi (SPE)	CAPCELL PAK C18 UG 120 (150 × 2,0 mm, 5 μm)	fosfátový pufr (74 mmol/l, pH 3,0), 0,2 ml/min	Ampero-ED	20	10	0,01	[49]
extrakce na tuhou fázi (SPE)	CAPCELL PAK C18 UG 120 (150 × 2,0 mm, 5 μm)	fosfátový pufr (74 mmol/l, pH 3,0), 0,2 ml/min	Coulo-ED	20	10	0,02	[49]
ředění a filtrace	Zorbax Sax (150 × 4,6 mm, 5 μm)	50 % citrát sodný (1 mmol/l, pH 6,5), 50 % acetonitril, 1 ml/min	MS	10	5	0,42	[64]
ředění a filtrace	Hypersil Hypurity C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	95 % kyselina trichloroctová (50 mmol/l, pH 2,7) a 5 % methanol, 0,6 ml/min	Ampero-ED	50	8	-	[65]
odstranění proteinů, filtrace pomocí centrifugačních filtrů Ultrafree	Poroshell EC-C18 (50 × 3 mm, 2,7 μm)	gradientová eluce, A: voda, acetonitril, kyselina mravenčí (47/50/3, v/v/v), B: acetonitril/kyselina mravenčí (98/2, v/v), 0,5 ml/min	MS/MS	5	5	0,15	[66]
ředění, srážení proteinů a filtrace	Luna C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	methanol a 50 μmol/l acetátový pufr (pH 4,0) (3:97, v/v), 0,7 ml/min	UV	20	-	-	[67]

LOQ – mez stanovitelnosti; DAD – detektor s diodovým polem; UV – detekce v ultrafialové oblasti; Ampero-ED – amperometrická elektrochemická detekce; Coulo-ED – coulometrická elektrochemická detekce; MS – hmotnostní spektrometrie

### 3.2.4 Mitochondriální respirační systém

Mitochondrie (Obr. 17) jsou semiautonómni organely, které se nacházejí téměř ve všech eukaryotních buňkách [81]. Mitochondrie jsou důležité pro energetický metabolismus buňky, produkují zhruba 90 % veškerého buněčného ATP, ale také se podílejí na regulaci reaktivních forem kyslíku (ROS) [82], homeostáze intracelulárního kalcia [83], procesu programované buněčné smrti [84], metabolismu buňky [85], procesu stárnutí [86], nádorové transformaci buňky [87] a na řadě dalších specifických buněčných funkcí.



Obr. 17 Struktura mitochondrie v živočišné buňce

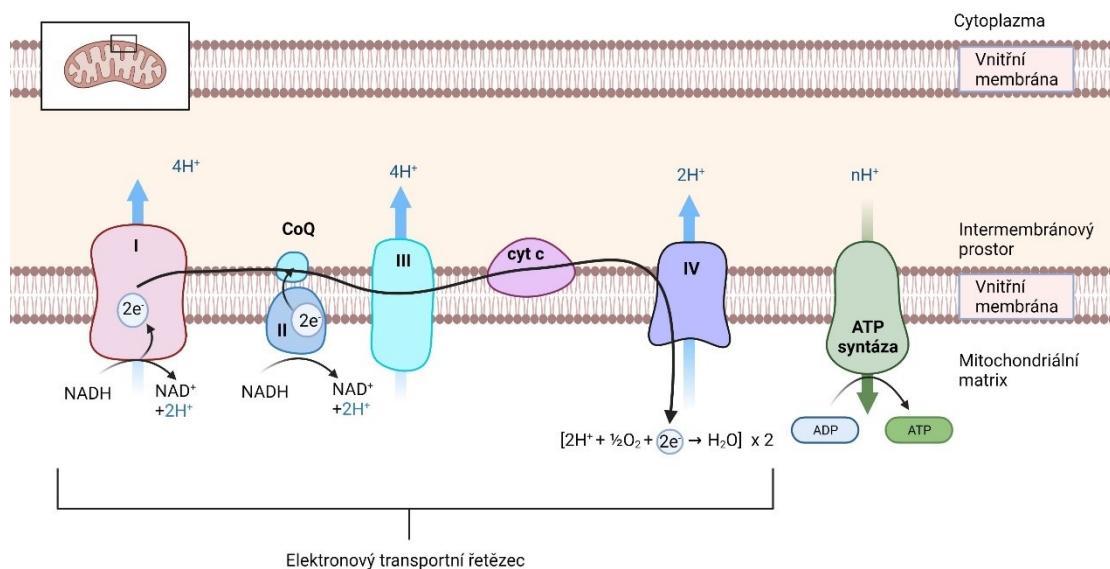
Velikost mitochondrií se pohybuje v rozmezí 0,5–3  $\mu\text{m}$  [88], přičemž mohou tvořit i komplexní větvené struktury [89]. Jako jediné obsahují mimojadernou, tzv. mitochondriální, deoxyribonukleovou kyselinou (mtDNA) [90]. Mitochondrie mají dvě fosfolipidové membrány oddělené intermembránovým prostorem. Zevní mitochondriální membrána (OMM) obsahuje póry a je svou strukturou blízká membráně cytoplazmatické [91]. Vnitřní mitochondriální membrána (IMM) je odlišná, obsahuje enzymy dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace, které tvoří mitochondriální elektronový transportní systém (ETS) [92]. IMM se v mitochondrii zakřivuje a přehýbá, čímž vytváří obraz mitochondriálních krist. Prostor ohraničen IMM je vyplněn mitochondriálním matrix, v němž se nachází mtDNA asociovaná s proteiny ve formě nukleoidu [89].

V matrix se také setkává řada základních metabolických drah v citrátovém neboli Krebsově cyklu, který vytváří redukční kofaktory následně využívané ETS na IMM v procesu známém jako buněčné dýchání [88].

ETS je jednou z nejdůležitějších struktur na IMM (Obr. 18). Komplexy proteinového charakteru nejsou uspořádány přímo do řetězce. Ve skutečnosti vytváří sbíhavou síť, v níž proudí elektrony dle spádu redoxního potenciálu směrem k finální redukci molekuly kyslíku. Uvolňování energie je spojeno se změnou prostorového uspořádání proteinových komplexů. Díky tomu dochází k transportu protonů z mitochondriální matrix do intermembránového prostoru, což je spojené s indukcí potenciálu na IMM, který umožňuje následnou fosforylaci ADP a tvorbu ATP [55, 92].

Respirační systém na IMM, obsahuje přes dvacet různých elektronových přenašečů. Jejich schopnost vázat a uvolnit proton je spojená se vzájemně odlišnými redoxními potenciály. Elektronové přenašeče nejsou v membráně umístěny samostatně, ale vytváří proteinové komplexy. Prvním redoxním párem participujícím na transportu elektronů na IMM je nikotinamidadeninukleotid v oxidované a redukované podobě (NAD<sup>+</sup>/NADH). NADH/ubichinon oxidoreduktáza (komplex I) je prvním článkem dýchacího řetězce a je zodpovědná za oxidaci NADH. Další branou elektronů do respiračního systému jsou mitochondriální dehydrogenázy, zejména sukcinátdehydrogenáza (komplex II) a glycerofosfátdehydrogenáza. Tyto enzymy transportují elektrony přímo na ubichinon. Při následné oxidaci ubichinonu prostřednictvím ubichinon/cytochrom c oxidoreduktázy (komplex III) jsou elektrony přeneseny na cytochrom c. Ten není v membráně pevně vázán, pouze naléhá k vnější straně IMM vázaný vodíkovými vazbami. Cytochrom c oxidáza (komplex IV) redukuje molekuly kyslíku, což vede k produkci vody. S výjimkou komplexu IV se elektrony v rámci mitochondriálního respiračního systému chovají reversibilně. Jsou tedy schopné zpětného procesu. ATP syntáza neboli komplex V využívá elektrochemický potenciál vytvořený komplexy I, III a IV k tvorbě ATP. Komplex V, je odpovědný za vznik většiny ATP. Syntéza ATP je, kromě dostatečného protonového gradientu, závislá také na přítomnosti ADP a volného fosfátu [93]. Mitochondriální poruchy oxidativní fosforylace mohou být příčinou mnoha onemocnění, které mají původ jak v mtDNA, tak i v jaderné deoxyribonukleové kyselině (DNA) na základě různého kódování proteinů dýchacího řetězce a ATP syntázy. Právě regulace homeostázy vnitrobuněčného prostředí je převážně zprostředkována mitochondriemi, čímž se funkčně podílejí na udržování metabolického stavu celého lidského organismu. Vzhledem k metabolickému zaměření mitochondrií můžeme také nalézt jejich využití

u klinického hodnocení metabolických a civilizačních onemocnění jako jsou septické stavy, diabetes mellitus, kardiovaskulární poruchy a obezita [94, 95].



Obr. 18 Schéma elektron transportního řetězce (ETS). NAD<sup>+</sup>/NADH – nikotinamidadenindinukleotid v oxidované a redukované formě; CoQ – koenzym Q (ubichinon); cyt c – cytochrom c; ADP – adenosindifosfát; ATP – adenosintrifosfát

### 3.3 Vybrané metody úpravy vzorku před analýzou

Komplexní biologický materiál obsahuje cílové látky, ale také látky balastní, které by měli být odstraněny před analýzou. Tyto balastní látky mohou ovlivnit přesnost a správnost výsledku, proto je úprava vzorku nedílnou součástí a zároveň často časově nejnáročnějším krokem celého procesu stanovení cílových látek (60–80 %) [96–99].

Metody pro úpravu vzorků lze rozdělit do dvou skupin, na metody konvenční a z nich vycházející metody moderní [96]. Mezi konvenční techniky řadíme homogenizaci, ředění, centrifugaci, filtraci, srážení proteinů, extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakci na tuhou fázi (SPE). Základem moderních extrakčních technik je zjednodušení vícekových postupů, zkrácení doby přípravy a snaha o snížení spotřeby rozpouštědel a potřebného množství vzorku na analýzu. Mnoho výhod mají automatická online uspořádání, která mohou zkrátit čas a eliminovat chyby

manuálního zpracování vzorku. Tyto techniky jsou založené zejména na miniaturizaci SPE [100].

V následujících podkapitolách budou uvedeny vybrané metody úpravy vzorku před analýzou, které byly použity v rámci této disertační práce.

### 3.3.1 Ředění

Ředění je jedním z nejjednodušších přístupů zpracování vzorku, jež je založeno na přidavku většího objemu rozpouštědla (s výhodou lze použít složky mobilní fáze), čímž dojde ke snížení koncentrace molekul matrice i analytů ve vzorku, a tím ke snížení matricových efektů (ME). Tato technika je výhodná zejména pro své rychlé provedení, nenáročnost a nízkou cenu [101]. Hlavní nevýhodou je nevhodnost použití jako samostatné techniky pro komplexnější matrice s vysokým obsahem proteinů a lipidů a v případě nízkých koncentrací cílových látek jejich další naředění [102]. Z tohoto důvodu se ředění používá nejčastěji v kombinaci s dalšími konvenčními i moderními technikami úpravy vzorku [103].

### 3.3.2 Filtrace

Filtrace se řadí mezi nejjednodušší techniky úpravy vzorku společně s ředěním. Obvykle představuje poslední krok úpravy vzorku před vlastní analýzou. Filtrací dochází k oddělení pevných složek matrice od tekutých pomocí porézního filtru. Pro biologický materiál se nejčastěji používají jednorázové nylonové, polytetrafluorethylenové, polyvinylidenfluoridové, polypropylenové, acetát celulózy filtry, anebo filtry z regenerované celulózy s různou porozitou. Pro HPLC analýzu se nejčastěji používají filtry mající porozitu 0,20 a 0,45  $\mu\text{m}$ . Existuje celá řada provedení filtrů, jako jsou stříkačkové, membránové, papírové, centrifugační filtry atd. Nejběžněji se v praxi používají stříkačkové filtry. Pro zpracování větších sérií vzorků je velmi výhodné využít filtračních mikrotitračních destiček nebo centrifugačních zkumavek s filtry (Obr. 19) [103–105]. Další výhodou centrifugačních zkumavek s filtry je jejich využití nejen pro filtraci, ale také pro odstranění proteinů bez přidavku organických rozpouštědel [105]. Jedná se o běžně komerčně dostupné zkumavky, které mají filtrační membránu například

z regenerované celulózy. K samotnému průchodu látek přes membránu poté dochází pomocí odstředivé síly centrifugy [104, 105].

Výběr typu filtru by se měl řídit zejména dle fyzikálně-chemických vlastností analytu, aby docházelo k odstranění balastních látek matrice a získání požadovaného analytu. Při výběru je důležité také posoudit kompatibilitu rozpouštědla vzorku s použitým materiálem filtru. Při nevhodném zvolení rozpouštědla vzorku se může membrána filtru rozpustit a následně kontaminovat filtrát [106].



Obr. 19 Microcon centrifugační zkumavka s filtrem (Merck, Darmstadt, Německo)

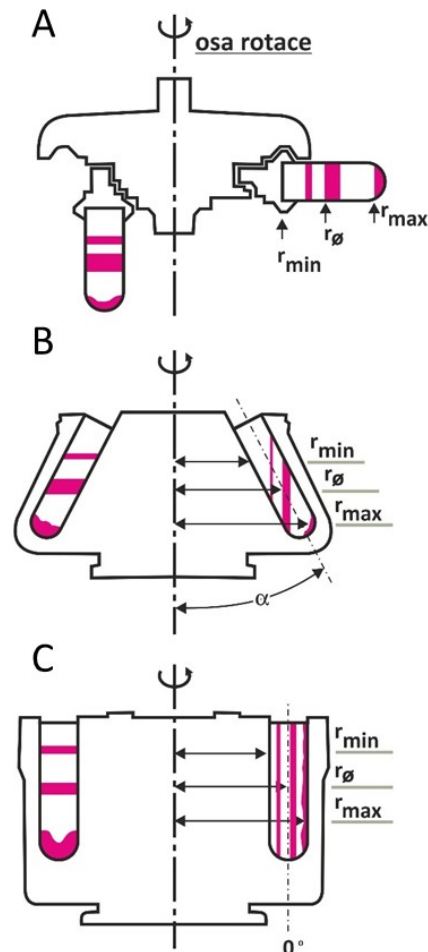
### 3.3.3 Centrifugace

Centrifugace patří mezi konvenční metody a je součástí prakticky většiny metod používaných pro úpravu vzorku před analýzou. Centrifugy se řadí mezi běžnou výbavu rutinních i výzkumných laboratoří. Proces centrifugace slouží zejména k oddělení tuhých částic pomocí odstředivé síly.

Centrifugy rozdělujeme podle docílené velikosti relativní odstředivé síly (RCF) nebo počtu otáček za minutu na nízkorychlostní (max.  $8\,000 \times g$ ), vysokorychlostní (max.  $60\,000 \times g$ ) a ultracentrifugy (max.  $1\,000\,000 \times g$ ). Centrifugy jsou běžně vybaveny rotory, mezi nejčastěji používané řadíme rotory úhlové, výkyvné nebo se svislým uložením kyvet (Obr. 20) [107–109]. Rotory mohou být určeny, jak pro skleněné zkumavky, tak také pro zkumavky typu Eppendorf nebo



mikrotitrační destičky. Materiály používané pro výrobu rotorů musí být lehké a pevné. Často jsou využívány slitiny hliníku a titanu, nověji pak kompozitní materiály typu uhlíkových vláken [110]. Hlavními výhodami centrifugace je její jednoduchost, rychlost a manuální nenáročnost [111].



Obr. 20 Nejběžnější typy rotorů. (A) Rotor výkyvný, (B) rotor úhlový a (C) rotor ve svislém uspořádání kyvet (převzato ze zdroje [112] a upraveno)

### 3.3.4 Srážení proteinů

Odstranění proteinů (protein precipitation, PP) se řadí mezi nejpoužívanější úpravy vzorku v bioanalýze. Jedná se o jednoduchou a rychlou techniku úpravy vzorku s výhodným použitím pro velké série vzorků, která může probíhat několika způsoby. První způsob je chemický pomocí organických rozpouštědel mísitelných s vodou (methanol, acetonitril, ethanol a jejich směsi), kyselin (kyselina trichloroctová

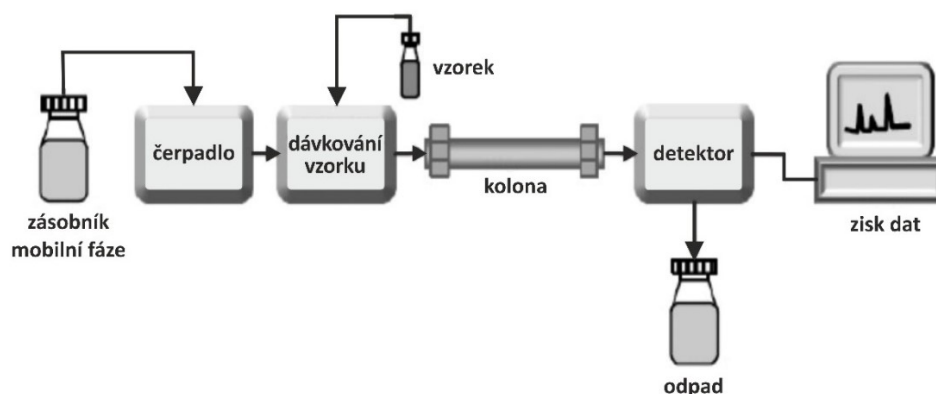
a trifluoroctová), zásad, solí (síran amonný) a solí kovů (síran zinečnatý a měďnatý). Dále může PP probíhat fyzikálně (pomocí teploty), enzymaticky (pomocí trypsinu nebo papainu) nebo mechanicky (pomocí filtrace). Po PP většinou následuje centrifugace a filtrace. Mezi hlavní nevýhody patří nedostatečné přečištění a nízká selektivita spojená s nízkou citlivostí detekce způsobenou naředěním vzorku. PP je možné provádět v různých formátech, např. ve zkumavce, mikrozukmavce nebo v mikrotitrační destičce [97, 113–116].

### **3.4 Chromatografické metody**

Chromatografické metody jsou součástí moderních separačních technik. Jejich základním principem je rozdílná distribuce dělených složek směsi mezi dvě nemísitelné fáze, kdy jedna je pohyblivá (mobilní) a druhá nepohyblivá (stacionární). K dělení látek ze směsi pak dochází na základě různých interakcí analytu s mobilní a stacionární fází [96]. Objev kapalinové chromatografie je datován na začátek 20. století a patří ruskému botanikovi Michailu Semjonoviči Cvětovi, který ji poprvé využil při výzkumu rostlinných pigmentů [117]. Dynamický rozvoj kapalinové chromatografie nastal od sedmdesátých let 20. století, kdy bylo představeno mnoho komerčních kapalinových chromatografů, které jsou dnes již běžnou výbavou analytické laboratoře.

#### **3.4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analytická separační metoda, která se využívá k oddělení složek směsi a jejich současné identifikaci a kvantifikaci v mnoha klinických i výzkumných laboratořích po celém světě [96]. Přístroj používaný pro HPLC se nazývá kapalinový chromatograf schéma jeho jednotlivých částí je uvedeno na Obr. 21.



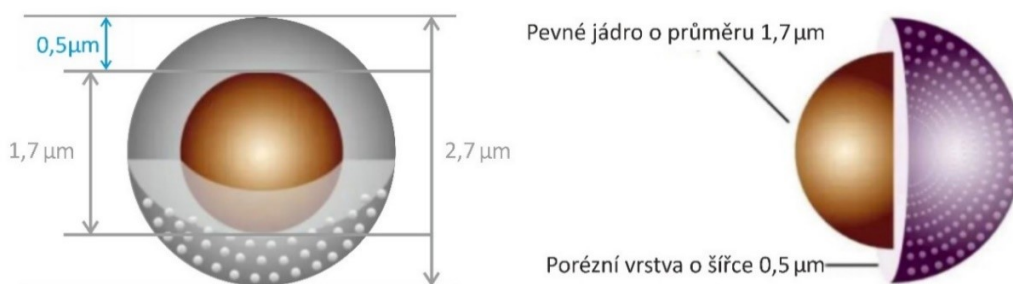
Obr. 21 Schéma kapalinového chromatografu (převzato ze zdroje [118] a upraveno)

Hlavními výhodami HPLC jsou univerzálnost použití, vysoká robustnost a přesnost měření. Univerzálnost podporuje široká nabídka přístrojů, kolon, detektorů a dalšího příslušenství, které jsou dnes komerčně dostupné [119, 120]. Mezi omezení HPLC patří zejména tlakové limity, které umožňují pracovat systému pouze do 40 MPa. Konvenční HPLC metody používají většinou kolony o rozměrech 100–250 × 4,6 mm o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$ , které poskytují analýzy dlouhé 10–60 minut. Avšak během posledních dvaceti let došlo k výraznému rozvoji této techniky, který vedl zejména k urychlení chromatografické separace.

Současným trendem v oblasti chromatografické instrumentace je ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC), která zahrnuje systémy pracující za ultra vysokých tlaků (100 MPa). Tato nová technologie umožnila vyhovět nárokům na rychlé a účinné separace díky možnosti aplikace užších a kratších chromatografických kolon plněných částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ . UHPLC systém musí také splňovat řadu nároků souvisejících právě s vysokým tlakem a rychlými analýzami. Jedná se zejména o mechanickou odolnost zajištěnou využitím materiálů typu polyetheretherketon (PEEK), ocel, pozlacená ocel a jejich kombinací. Dále využití robustních čerpadel, rychlých dávkovacích systémů vzorku o velmi malém objemu a s minimálními mimokolonovými objemy. Současně je kladen důraz na vysokou frekvenci sběru dat a jejich analýzu [121–125].

V oblasti technologií stacionárních fází jsou jedním z trendů povrchově porézní částice, které umožňují zvýšit účinnost a rychlost chromatografické separace bez nutnosti nárůstu zpětného tlaku. Tyto částice lze tedy použít v běžné HPLC instrumentaci se zachováním srovnatelné efektivity jako v UHPLC. Tím představují

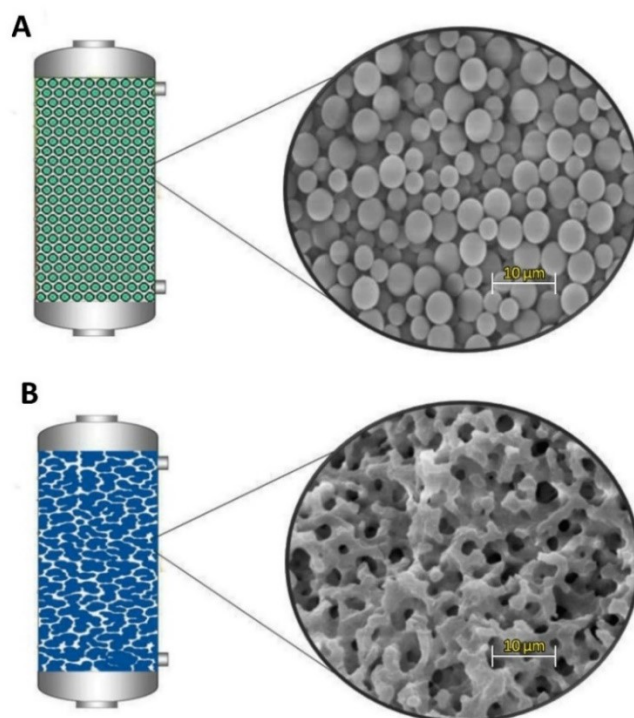
vhodný nástroj pro přenos metod mezi oběma systémy. Tyto výhodné chromatografické vlastnosti jsou umožněny díky jejich struktuře. Jedná se o silikagelové částice, které jsou tvořeny rigidním jádrem a vrstvou porézního silikagelu, která tvoří 75 % celkového objemu částice (Obr. 22). Díky neporézní části, molekuly analytů nepronikají hluboko do struktury částice, čímž se snižuje odpor proti převodu hmoty a axiální difuze. V kombinaci s rovnoměrnější distribucí a velikostí částic dochází ke zlepšení přenosu hmoty, což vede k vysoké účinnosti chromatografické separace, urychlení analýzy a snížení spotřeby rozpouštědel. V současné době jsou komerčně dostupné částice 1,3–5  $\mu\text{m}$  s různou šířkou porézní vrstvy a velikostí pórů. Existuje také široká škála modifikací povrchu, které umožňují zvýšit selektivitu separace, např. polárně modifikované C18 silikagelové částice, které lze aplikovat při použití 100% vodné mobilní fáze [126–129].



Obr. 22 Struktura povrchově porézních částic (převzato ze zdroje [130] a upraveno)

Jedním z dalších trendů je použití fází s monolitickým sorbentem (Obr. 23). Monolitické kolony jsou naplněny jedním kusem porézního materiálu. Oproti částicovým kolonám mají výjimečné hydrodynamické vlastnosti, které umožňují dosahovat vyšší průtokové rychlosti mobilní fáze s menším nárůstem zpětného tlaku systému, což je také spojeno s kratší dobou analýzy. Jejich porézní struktura je tvořena ze dvou typů pórů: makropórů (velikost pórů  $>50$  nm) a mezopórů (2–50 nm) [131]. Velké makropóry zajišťují konvektivní tok mobilní fáze a středně velké mezopóry zajišťují dostatečně velký separační povrch. Podle chemické povahy a způsobu přípravy lze tyto stacionární fáze rozdělit na (i) anorganické monolity na bázi silikagelu a (ii) monolity na bázi organických polymerů. Jejich povrch může být modifikován různými funkčními skupinami. Využití monolitů v HPLC separaci bylo

poprvé publikováno v devadesátých letech 20. století [132]. Dnes monolitické kolony se využívají v oblastech výzkumu a klinické praxe, kde je profitováno z jejich dlouhé životnosti a robustnosti pro analýzu velkých sérií komplexních biologických matic [133–135].

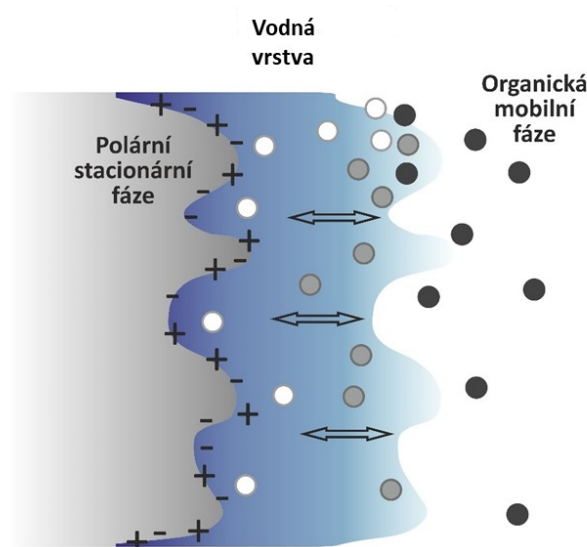


Obr. 23 Ukázka struktury částicové (A) a monolitické (B) stacionární fáze (převzato ze zdroje [136] a upraveno)

Na poli chromatografických módů zaznamenala vysokou oblíbenost hydrofilní interakční chromatografie (HILIC). I když se nejedná o zcela nový chromatografický mechanismus, tak jeho využití narůstá díky možnosti separace velmi polárních látek, pro které není vzhledem k malé retenci vhodné reverzní uspořádání HPLC. Mechanismus zodpovědný za HILIC separaci stále není zcela objasněn. Navrhovaným principem separace je rozdělování analytů mezi hydrofobní část mobilní fáze a hydrofilní vrstvu vody, která je imobilizována na povrchu polární stacionární fáze. Na polárních centrech stacionární fáze dochází k přednostní adsorpci vody a vzniká difúzní vrstva se snižujícím se gradientem koncentrace vody směrem do mobilní fáze (Obr. 24). K separaci látek poté dochází díky specifickým i nespecifickým interakcím se stacionární fází i vodnou vrstvou na jejím povrchu. Mechanismy interakce mohou

být adsorpce, vznik vodíkových vazeb, van der Waalovy síly nebo elektrostatické interakce. Stacionární fáze, které jsou používány pro HILIC, lze rozdělit do tří skupin na základě elektrostatických interakcí. První jsou fáze neutrální bez elektrostatických interakcí, druhé jsou fáze nabitě vykazující silné interakce a poslední skupinou jsou zwitterionty, které vykazují slabé elektrostatické interakce. Nejpoužívanějšími fázemi jsou silikagel, hybridní silikagel a silikagel modifikovaný aminopropyllovou funkční skupinou nebo sulfobetainem [137, 138].

Výhodnou aplikaci HILIC módu pro stanovení polárních látek lze nalézt v kombinaci s MS. Vysoký podíl organické složky v mobilní fázi je dobře kompatibilní s ionizací elektrospřejem. Naopak mezi nevýhody patří požadavek rozpouštědla vzorku, který by měl být složením, co nejpodobnější mobilní fázi, dále malý objem nástřiku a dlouhá ekvilibrace kolony [42, 137, 138].



Obr. 24 Schéma principu HILIC separace. Analyty se eluují dle jejich povahy se zvyšující se hydrofilitou (bílé částice =hydrofilní analyt, šedá částice = analyty s nižší hydrofilitou a černé částice = hydrofóbní analyt) (převzato ze zdroje [139] a upraveno).

### 3.4.2 HPLC detektory

Nedílnou součástí kapalinového chromatografu je detekční systém. Ideální HPLC detektor by měl být univerzální, citlivý, selektivní, nedestruktivní, měl by mít široký dynamický rozsah a nulový mimokolonový příspěvek. Navíc jeho signál by neměl být ovlivněn změnami teplot, průtoku a složením mobilní fáze (gradientová eluce).

Bohužel žádný z detektorů nedisponuje těmito všemi vlastnostmi. Nejpoužívanějšími detektory jsou UV/Vis spektrofotometry. V posledním desetiletí dochází k významnému nárůstu použití MS jako detekční techniky, která je velmi selektivní a citlivá [96, 140].

Během rozvoje nové UHPLC instrumentace bylo nutné zareagovat i na poli detekce zejména ve směru ultrarychlých analýz. Nové detekční systémy pracují s vysokou rychlostí sběru dat (až 200 Hz) se zachovanou vysokou citlivostí a nízkými hladinami šumu, samozřejmostí je také minimální mimokolonový příspěvek [141, 142].

V následujících kapitolách je uveden přehled detekčních technik pro kapalinovou chromatografii využitých v rámci této disertační práce.

#### 3.4.2.1 Spektrofotometrická detekce

Spektrofotometrické detektory jsou nejvíce využívanými detektory v HPLC. Jsou založené na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek 190–800 nm (oblast UV/Vis). Aby bylo možné detekovat molekuly analytu, musí ve své struktuře obsahovat chromofor (systém konjugovaných dvojných, násobných a jednoduchých vazeb mezi atomy). Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambertově-Beerově zákoně a vyjádřeno jako hodnota absorbance (A):

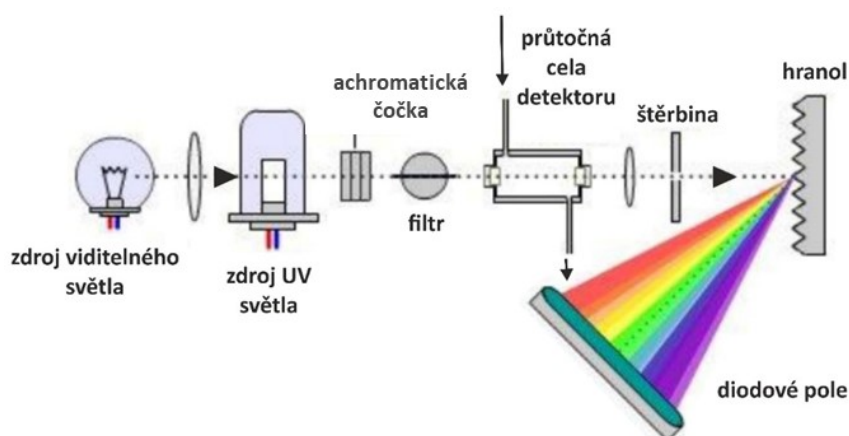
$$A = l \times \varepsilon \times c$$

Kde  $l$  je délka optické dráhy (šířka květy s měřeným analytem),  $c$  je koncentrace absorbující složky a  $\varepsilon$  je absorpční koeficient, který je charakteristický pro každou vlnovou délku absorbovaného záření.

Spektrofotometrické detektory můžeme dělit na detektory s fixní, volitelnou (programovanou) nebo měnitelnou vlnovou délkou. UV/Vis detektory využívají jako zdroj světla deuteriovou (UV) nebo wolframovou lampu (Vis) nebo jejich kombinace. Polychromatické světlo je dále vedeno na monochromátor, jehož úkolem je separace vybrané specifické vlnové délky, která je následně propuštěna do průtokové optické cely. Posledním typem spektrofotometrického detektoru je detektor s diodovým polem (DAD), který umožňuje záznam celého spektra v oblasti vlnových délek

190–600 nm v reálném čase bez přerušení chromatografické separace (Obr. 25).

Záření ze světelného zdroje (deuteriová výbojka) se průchodem měrnou celou rozloží na holografické mřížce a pomocí soustavy fotodiód pak dochází k měření jednotlivých vlnových délek, kde jednotlivé fotodiody (sdružené s kondenzátory) snímají změnu absorpance na velmi úzkém rozsahu vlnových délek. Absorpční spektrum je získáno na základě periodického vybíjení a nabíjení kondenzátoru, za předpokladu, že velikost proudu dobíjejícího kondenzátor je úměrná intenzitě záření. Tento typ detekce umožňuje porovnat získaná spektra s knihovnou, což zvyšuje selektivitu detekce. Díky získání 3D dat můžeme také vypočítat čistotu píku, abychom zjistili případnou koeluci [96, 143].



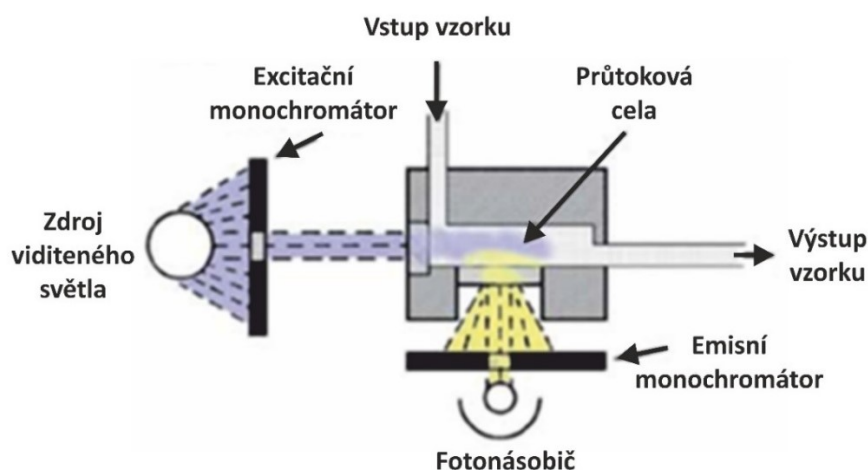
Obr. 25 Schéma detektoru s diodovým polem (DAD) (převzato ze zdroje [144] a upraveno)

### 3.4.2.2 Fluorescenční detekce

Fluorescenční detektory zaznamenávají sekundární (emisní) záření, které uvolňuje analyt po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Dochází k absorpci záření, jehož prostřednictvím přecházejí molekuly analytu do vyšších vibračních úrovní a při přechodu do nižších úrovní je absorbovaná energie vyzářena ve formě fluorescence. Záření dopadá na fotonásobič, který poskytuje proud úměrný toku emitovaného záření. Fotonásobič je umístěn kolmo na zdroj záření, aby bylo minimalizováno rušení od rozptýleného excitačního paprsku. Rtuťová nebo xenonová výbojka s interferenčními filtry, které zajišťují monochromatické záření, je většinou používány jako zdroj excitačního záření (Obr. 26) [145].



Tyto detektory se vyznačují vysokou citlivostí a selektivitou. Lze je použít pouze na analyty, které vykazují nativní fluorescenci nebo po vhodné derivatizační reakci. Celkově je FLD široce využívaným typem detekce, avšak v posledních letech ji nahrazuje ještě citlivější a selektivnější detekce pomocí MS, bez nutnosti derivatizace vzorku. I přesto, pro určité typy analytů s přirozenou fluorescencí, které hůře ionizují, se jedná o vhodnou metodu detekce [96, 145, 146].



Obr. 26 Schéma fluorescenčního detektoru (FLD) (převzato ze zdroje [144] a upraveno)

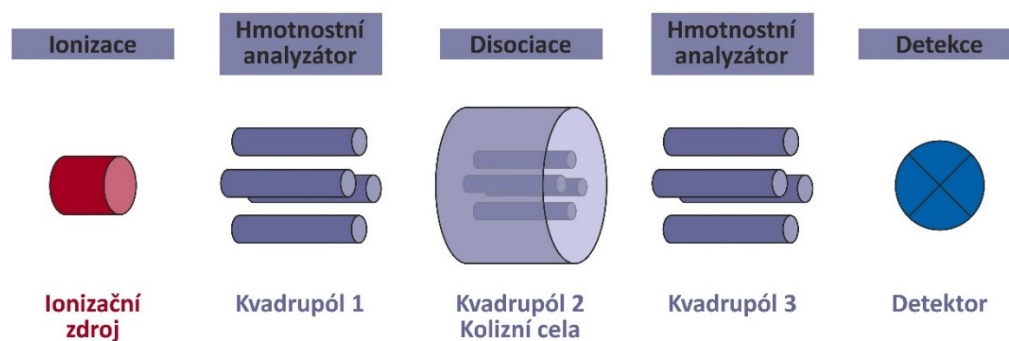
### 3.4.2.3 Hmotnostně spektrometrická detekce

Hmotnostní spektrometrie (MS) je detekční technika založená na ionizaci vzorku a následném rozdělení iontů dle poměru hmotnosti,  $m$  a náboje,  $z$  ( $m/z$ ). V poslední fázi ionty putují do detektoru, kterým může být fotonásobič, elektronásobič nebo mikrokanálová destička. Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum [147, 148]. Ionizační techniky se dělí na tvrdé a měkké, kdy tvrdé ionizační techniky (zejména elektronová ionizace) se využívají ve spojení s plynovou chromatografií. Mezi nejběžnější měkké ionizační techniky ve spojení s HPLC prováděné za atmosférického tlaku se řadí ionizace elektrosprejem, chemická ionizace nebo fotoionizace. Pro převod vzorků z kapalně fáze do plynné (tzn. zmlžování, nebulizace) je využíván dusík nebo stlačený vzduch.

Následuje separace iontů založená v rozdílném poměru  $m/z$  ve hmotnostním analyzátoru, kde dochází k jejich urychlení a fokusaci pomocí iontové optiky. Mezi analyzátoři patří kvadrupól, iontová past (lineární nebo 3D), magnetický

analyzátor, analyzátor doby letu, orbitrap a iontová cyklotronová rezonance. Základními parametry hmotnostního analyzátoru jsou rozlišovací schopnost, hmotnostní rozsah, správnost určení  $m/z$ , lineární dynamický rozsah a rychlost. Tento typ detekce poskytuje vysokou citlivost a možnost získávání kvalitativních i kvantitativních informací o cílových látkách, které lze využít pro cílenou i necílenou analýzu. Pro přesnější a citlivější stanovení látek ze směsí složitých biologických matic je výhodné spojení dvou hmotnostních analyzátorů stejného druhu tzv. tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) nebo dvou analyzátorů různého druhu, tzv. hybridní MS [147–149]. Ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS) se často využívá konfigurace založená na spojení tří kvadrupólových analyzátorů (trojitý kvadrupól, QqQ). První a třetí analyzátor pracují jako standardní kvadrupólové analyzátory a druhý slouží jako kolizní cela k fragmentaci iontů (Obr. 27). Ve výsledném spektru při analýze selektivního záznamu více reakcí (MRM) sledujeme fragmentové ionty, které vznikly rozpadem vybraného prekurzorového iontu. Tento typ skenu je používán v kvantitativní analýze analytů přítomných ve komplexních směsích látek, jelikož dosahuje vysoké selektivity a citlivosti [96].

Spojení LC-MS je zejména využíváno k identifikaci látek a jejich kvantifikaci. Hlavními výhodami jsou možnost odhalení koeluze píků, analýzy složitých směsí vzorků, spolehlivější identifikace látek díky strukturní informaci a retenčnímu času, zlepšení kvality spektrálních dat a lepší spolehlivost kvantitativní analýzy díky izotopicky značeným vnitřním standardům (IS). Využití vnitřní standardizace je velmi důležité zejména v bioanalýze ke kompenzaci ME u složitých biologických matic [150, 151].



Obr. 27 Schéma trojitého kvadrupólu s iontovým zdrojem a detektorem (převzato ze zdroje [152] a upraveno)

## 3.5 Ostatní metody separace a detekce používané v této práci

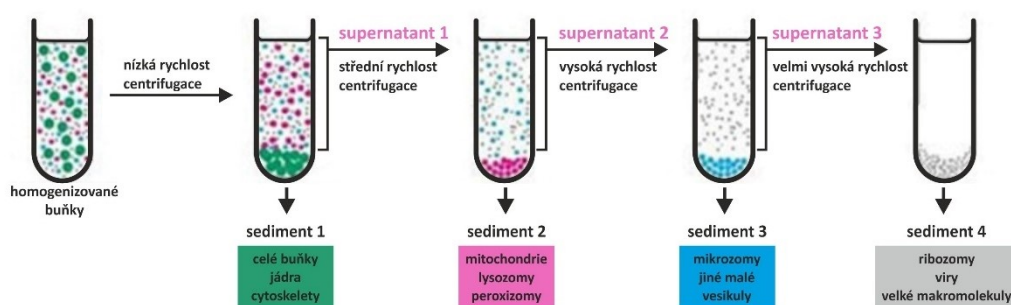
### 3.5.1 Centrifugace

Centrifugace je jednoduchá separační analytická metoda, při níž dochází k separaci látek roztoku pomocí odstředivé síly. V běžných rutinních a výzkumných laboratořích se centrifugace většinou používá k izolaci směsí kapalin, buněk, plazmy/séra od krevních elementů nebo k frakcionaci makromolekul podle hustoty [111, 153, 154].

Techniky centrifugace je možné klasifikovat na analytické a preparativní. Analytická centrifugace je používána pro studium a charakterizaci sedimentujících částic. Analytické centrifugy jsou vybaveny optickým detekčním systémem, který umožňuje sledovat sedimentační proces v reálném čase. Tento typ centrifugace nachází uplatnění např. při stanovení čistoty, oligomerní struktury, průměrné molekulové hmotnosti či konformace makromolekul [153–155]. Preparativní centrifugace slouží zejména k přípravě, separaci a přečištění vzorku pro následné použití. Na rozdíl od analytického postupu, preparativní centrifugace postrádá zařízení pro sledování průběhu sedimentace. Preparativní centrifugace se dále dělí na diferenciální a v hustotním gradientu.

#### 3.5.1.1 Diferenciální centrifugace

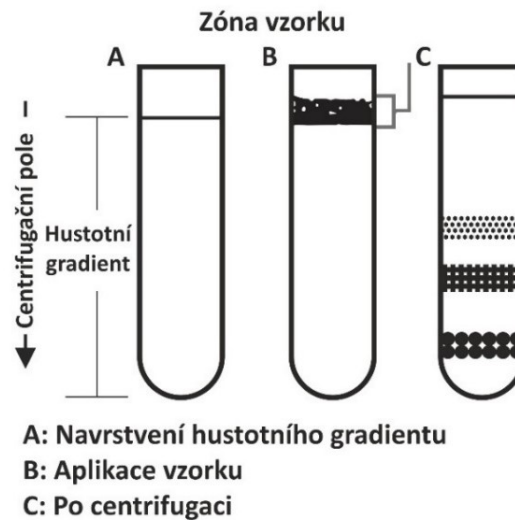
Diferenciální centrifugace je nejběžnější forma centrifugace. Částice v roztoku se separují na základě rozdílů v rychlosti sedimentace v závislosti na centrifugační rychlosti. Sedimentační vlastnosti látky závisí na její velikosti a hustotě a na hustotě prostředí. Diferenciální centrifugace je především využívána k opětovnému oddělování buněčného lyzátu k separaci buněčných složek s klesající velikostí a hustotou (Obr. 28). Výhodou této techniky je rychlost a jednoduchost. Mezi nevýhody patří získání buněčné frakce o nižší čistotě, pokud se v roztoku nachází složky o podobné velikosti a hustotě [109, 156, 157].



Obr. 28 Princip diferenciální centrifugace (převzato ze zdroje [157] a upraveno)

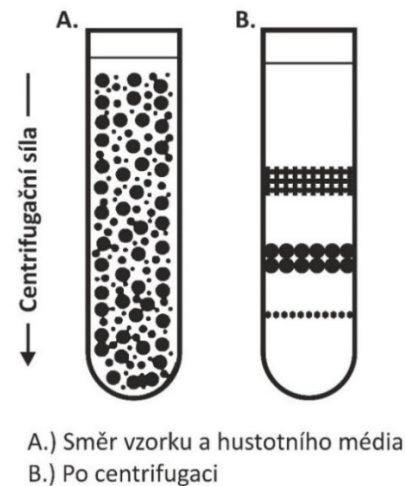
### 3.5.1.2 Centrifugace v hustotním gradientu

Dalším typem preparativní centrifugace je centrifugace v hustotním gradientu, kterou lze využít k separaci částic o podobné velikosti, ale různé hustotě. Ve zkumavce se nejdříve vytvoří hustotní gradient vrstvením gradientního média a na vrch se přidá vzorek. Jako gradientní média se nejčastěji používá sacharóza, glycerol, Ficoll, dextran, soli CsCl, Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> či NaBr a Percoll. Jejich použití se řídí dle gradientu. Roztok Percollu je nejčastěji používán pro vytvoření kontinuálního hustotního gradientu, který se utváří po centrifugaci v celé délce zkumavky. Naopak diskontinuální gradient nejčastěji využívá roztok Ficollu. Po navrstvení suspenze tohoto roztoku a následné centrifugaci se vytvoří pásy o různé hustotě, která se zvyšuje směrem od horní vrstvy k vrstvě dolní. Vzniklé přechody mají ostrá rozhraní. Gradientovou centrifugaci lze dále dělit na zonální a izopyknickou [110, 112, 159, 160]. Zonální centrifugací dochází k dělení částic na základě jejich sedimentačních koeficientů, tzn. tvaru a molekulové hmotnosti (Obr. 29).



Obr. 29 Princip zonální centrifugace (převzato ze zdroje [160] a upraveno)

Naopak při izopyknické centrifugaci dochází k separaci látek dle jejich hustoty, nezávisle na jejich velikost a molekulové hmotnosti (Obr. 30). Na začátku separace je vzorek rozpuštěn v gradientním médiu a centrifugace probíhá až do ustanovení rovnováhy roztoku. Místu, kde se shoduje hustota částic s hustotou gradientního média, říkáme izopyknický či rovnovážný bod [111, 161].



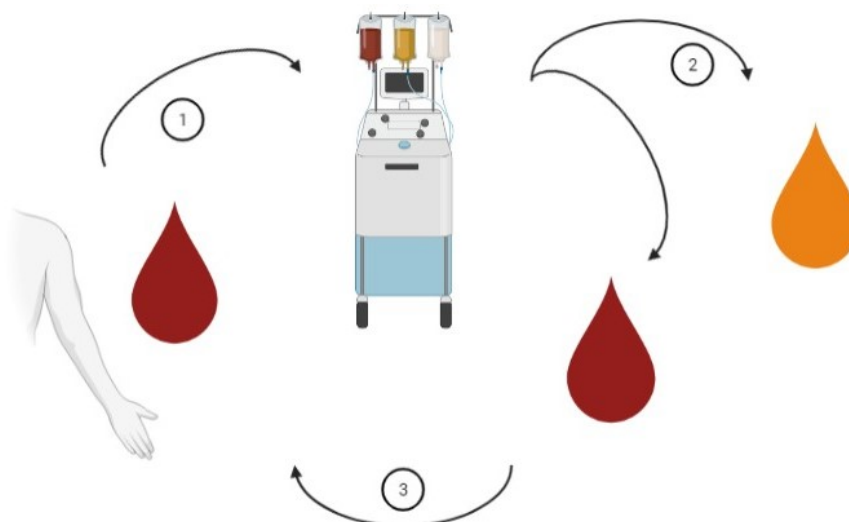
Obr. 30 Princip izopyknické centrifugace (převzato ze zdroje [111] a upraveno)

### 3.5.2 Aferéza

Aferéza (hemaferéza) je proces separace, kdy krev se nejprve smíchá s antikoagulačním činidlem a následně protéká separátorem na principu

centrifugace, který odděluje určitou ze složek krve. Zbývající složky se vrací zpět do těla pacienta či dárce s náhradou nebo bez náhrady koloidů či krystaloidních roztoků [162]. Aferézu můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: dárcovskou a terapeutickou. Dárcovská aferéza slouží k přípravě velkého objemu krevních složek, např. trombocytů nebo plazmy. Naopak léčebná aferéza je výkon, při kterém se redukuje obsah patologicky aktivních komponent v plazmě nebo zmnožených buněčných elementů v krevním oběhu pacienta [163]. Léčebné aferetické postupy se dále dělí dle složky, kterou chceme redukovat na plazmaferézy, erythrocytaferézy (výměna nebo odběr červených krvinek), leukocytaferézy (separace bílých krvinek), trombocytaferézy (odběr krevních destiček), odběry krvetvorných buněk periferní krve atd. [164, 165].

V rámci této disertační práce byl využit odběr trombocytů pomocí dárcovské aferézy pro vyhodnocení mitochondriální respirace, a proto bude následující část věnována tomuto typu separace. Aferéza trombocytů je standardně prováděna od zdravých dárců krve a může probíhat diskontinuálně nebo kontinuálně na průtokových odběrových systémech. Diskontinuální způsob je také označován jako jednožilní (jeden žilní vstup), krev je sbírána a zpracována po částech v intervalech asi po 200 ml (Obr. 31). Následně dochází k separaci krve a k selektivnímu získání požadované komponenty, zatímco ostatní komponenty jsou vráceny stejnou žilou zpět do krevního oběhu dárce. Při použití kontinuálního způsobu se jedná o dvoužilní přístup, kdy je periferní krev odebírána z jedné žíly a po separaci se vrací do žíly na druhé ruce [166]. Celý aferetický proces trvá 60–100 minut. V případě separace trombocytů jsou trombocyty odděleny do 150–450 ml plazmy (transfúzní přípravky trombocytů resuspendovaných v plazmě) a červené krvinky s plazmou jsou vráceny zpět do dárcovy cirkulace. Během jednoho procesu jsou získány 2–3 transfúzní jednotky. Jedna transfúzní jednotka by měla obsahovat minimálně  $200 \times 10^9$  trombocytů [167, 168].



Obr. 31 Schéma aferetického sběru trombocytů. (1) Krev je odebírána z periferní žíly dárce, (2) separace trombocytů a (3) vrácení krve zpět do cirkulace dárce.

Pro separaci trombocytů se běžně využívají dva typy přístrojů: separátor TRIMA Accel (Terumo BCT, San Diego, CA, USA) a separátor Haemonetics MCS+ (Haemonetics Corp., Boston, MA, USA) (Obr. 32) [166]. Aferetický výkon může být ovlivněn různými faktory, jako jsou: účinnost separátoru, délka trvání odběru, tělesný stav, pohlaví, hematokrit, a počet trombocytů před odběrem ( $<150 \times 10^9/l$ ) u dárce krve.



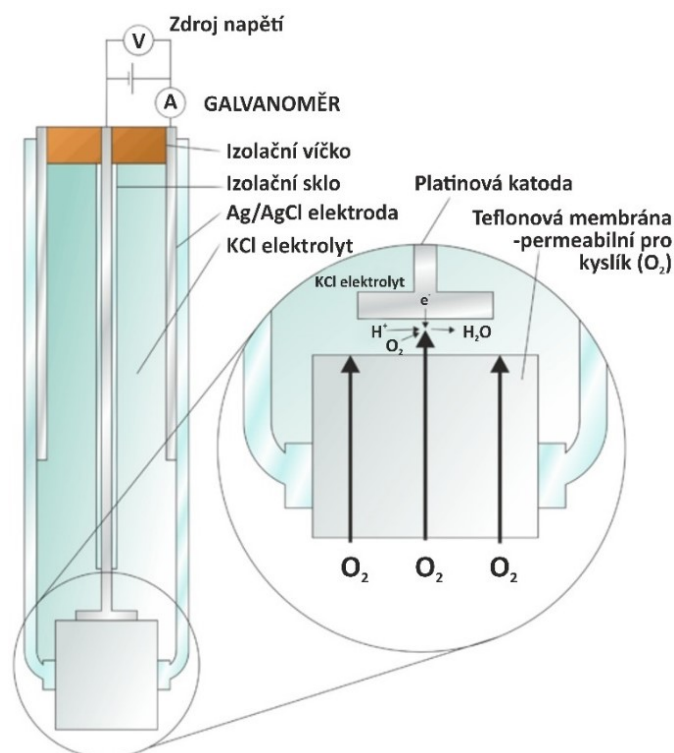
Obr. 32 Ukázka separátorů krv. (A) Haemonetics MCS+ (Haemonetics Corp., Boston, MA, USA) a (B) TRIMA Accel (Terumo BCT, San Diego, CA, USA) (převzato ze zdroje [169, 170])

### 3.5.3 Amperometrie – Clarkův senzor

Amperometrii řadíme mezi elektroanalytické metody. Je založena na měření elektrického proudu při konstantním napětí [171]. Na pracovní elektrodu je vložen

konstantní potenciál a měří se proud na elektrodě v závislosti na čase. Potenciál pracovní elektrody se zpravidla volí takový, aby elektrodou tekla limitní proud sledované látky. Koncentrace přítomného analytu je dána velikostí proudu. Jelikož se jedná o metodu odvozenou od voltametrických a polarografických metod, je možné použít stejnou instrumentaci. Výhodou amperometrie je sledování okamžité odezvy na změnu koncentrace dané látky, naopak nevýhodou je možnost stanovení pouze jedné složky vzorku [171].

Clarkův senzor (Clarkova elektroda), který byl poprvé použit ve čtyřicátých letech 20. století a byl pojmenován podle objevitele Lelanda C. Clarka, je dnes nejnámějším a nejvyužívanějším amperometrickým systémem v bioanalýze. Clarkova kyslíková elektroda (Obr. 33) se používá pro stanovení rozpuštěného kyslíku v kapalinách a plynech. Elektrolytický proud je přímo úměrný koncentraci kyslíku ve vzorku [172–175].

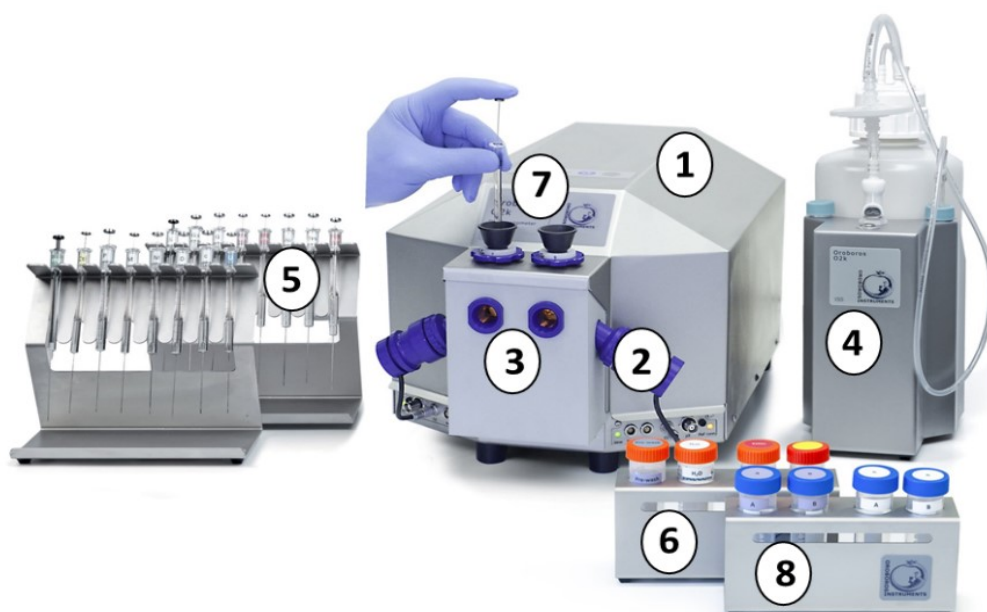


Obr. 33 Polarografický kyslíkový senzor, který se skládá z platinové katody a argentchloridové anody (Ag/AgCl). KCl se používá jako elektrolyt a je uzavřený teflonovou propustnou membránou pro kyslík (převzato ze zdroje [176] a upraveno).

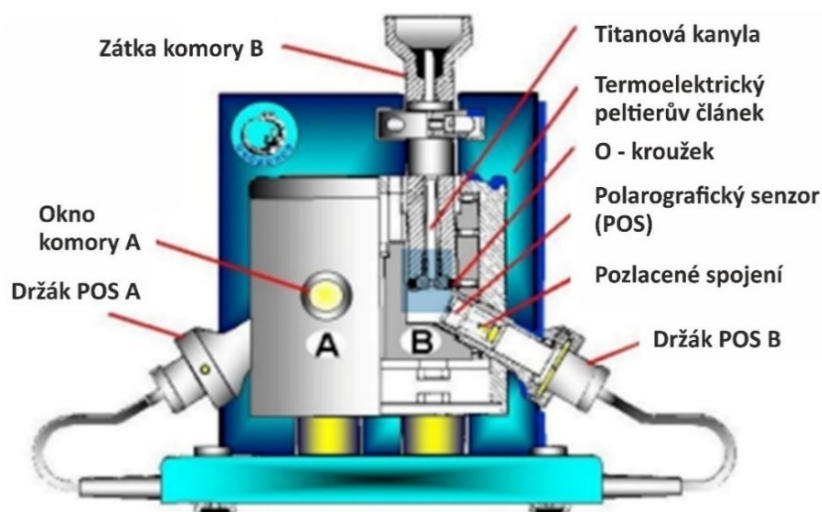


### 3.5.3.1 Respirometrie

Polarografické kyslíkové senzory se také dají využít pro zhodnocení mitochondriální respirace pomocí respirometrie s vysokou sensitivitou (HRR, High Resolution Respirometry). Příklad přístroje využívaný pro respirometrii se nazývá oxygraf např. od společnosti Oroboros Instruments (Innsbruck, Rakousko) (Obr. 34). Tento systém slouží k citlivé detekci koncentrace kyslíku v uzavřeném systému. Oxygraf je vybaven dvěma polarografickými kyslíkovými sensory (Obr. 35 a 36) se zlatou katodou a stříbrnou anodou, které jsou upevněny v separovaných komůrkách o definované velikosti 2 nebo 0,5 ml. Komůrky jsou vyrobené z duranového skla, které omezuje difúzi kyslíku do média. Příklad přístroje má také schopnost udržovat teplotu s přesností až na 0,001 °C. Díky těmto vlastnostem oxygraf umožňuje rozeznat minimální rozdíl v koncentraci rozpuštěného kyslíku (až 50 nmol/l) a je vhodným přístrojem ke studiu mitochondriální fyziologie [177, 178].



Obr. 34 Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko). 1 – Oxygraf-2k; 2 – polarografický sensor; 3 – komůrky oxygrafu pro měřený vzorek; 4 – pumpa určená pro čištění komůrek; 5 – Hamiltonovy stříkačky určené pro titraci substrátů a inhibitorů do komůrky oxygrafu; 6 – Falcon zkumavky s ethanolem a destilovanou vodou na oplach Hamiltonových stříkaček; 7 – Zátka s kapilárou pro aplikaci substrátů a inhibitorů do komůrky; 8 – Falcon zkumavky používané jako držák na zátku při čištění komůrky (převzato ze zdroje [179] a upraveno)



Obr. 35 Oroboros Oxygraf (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko). (A) okno do komůrky A, (B) skleněná komůrka B. Obě komůrky jsou umístěné v měděném bloku (umožnění regulace teploty), polarografický senzor kyslíku (POS) je chráněn gumovým pouzdem pro utěsnění POS proti sklu komůrky a tělo senzoru je tvořeno polyetheretherketonem (PEEK) (převzato ze zdroje [180] a upraveno).



Obr. 36 Průřez polarografickým senzorem v oxygrafu. PEEK – polyetheretherketon (převzato ze zdroje [180] a upraveno)

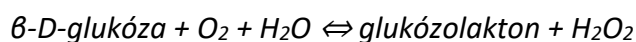
HRR umožňuje měření mitochondriální respirace v různých buněčných kulturách a tkáních, čehož se využívá při diagnostice mnoha onemocnění a patologických stavů. Můžeme sledovat změny v metabolismu u nádorových, kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob, u diabetických a obézních pacientů nebo také během procesu stárnutí [181].

Hodnocení jednotlivých složek ETS umožňují tzv. respirační SUIIT protokoly (z anglického „Substrate, Uncoupler, Inhibitor, Titration“). Ty jsou vystavěné na po sobě jdoucích přídavcích různých substrátů, inhibitorů a rozpřahovačů do měrné komůrky přístroje [177]. Použití těchto protokolů umožňuje hodnocení různých respiračních stavů, a to prostřednictvím buď jednoduchých a krátkých, nebo velice komplexních a několika hodinových protokolů. Spřaženým respiračním stavem, ve kterém je spotřeba kyslíku na IMM nejmenší, je stav LEAK (odvozené z „leak“ – propouštět). Toho dosáhneme nedostatkem ADP, který vyvoláme substráty pro tvorbu redukčních kofaktorů. OXPPOS (odvozené z „oxidative phosphorylation“ – oxidativní fosforylace) umožňuje hodnocení stavů, při níž dochází k syntéze ATP z ADP. Během tohoto procesu, který potřebuje ATP syntázu, dochází k transportu vodíkových iontů do mitochondriálního matrix. Stav ETS (odvozené z „electron transfer system“ – elektronový transportní systém) hodnotí maximální kapacitu dýchacího řetězce přenášet elektrony. K dosažení ETS stavu musíme použít tzv. rozpřahovače, což jsou látky fungující jako protonofory, které transportují vodíkový proton dle koncentračního gradientu a způsobí rozpřažení oxidativní a fosforylační složky ETS. V neposlední řadě také ROX (odvozené z „residual oxygen consumption“ – reziduální spotřeba kyslíku), který představuje zbytkové dýchání v důsledku oxidativních vedlejších reakcí po inhibici ETS stavu [182–184].

### 3.5.3.2 Aplikace v biosenzorech

Amperometrický Clarkův senzor se také hojně využívá jako detekční prvek v biosenzorech. Tento biosenzor má většinou imobilizován enzym na permeabilní membráně, který slouží jako katalyzátor přeměny substrátu na produkty. V případě účasti rozpuštěného kyslíku u enzymatické reakce je možné zaznamenat změnu jeho koncentrace, která je úměrná koncentraci substrátu. Enzymy, převážně ze skupiny oxido-reduktáz lze s výhodou použít ke konstrukci finančně přijatelných čidel pro selektivní stanovení mnoha látek a lze tak nahradit i nákladnější techniky, jako jsou HPLC či CE.

Nejnámějších amperometrickým senzorem je čidlo s imobilizovanou glukózooxidázou v glukometrech na stanovení glukózy v krvi, který se využívá pro sledování hladin cukru u pacientů s diabetes mellitus [185, 186]. Za katalýzy glukózooxidázou se glukóza oxiduje kyslíkem podle následující rovnice:



Množství vzniklého peroxidu je tedy přímo úměrné obsahu glukózy, které je snímáno kyslíkovým čidlem, založeném na principu amperometrického stanovení, kde jsou na testovacím proužku natištěny elektrody (katoda, referenční anoda a pomocná elektroda), překryty membránou a uloženy na porézním podkladu. Uspořádání je podobné klasickému provedení Clarkovy elektrody [185–188].

### 3.6 Validace bioanalytických metod

Nedílnou součástí ověření spolehlivosti jakékoli vyvinuté metody a metodiky pro stanovení analytů je proces validace, který má prokázat, že metoda poskytuje reprodukovatelné a spolehlivé výsledky a je použitelná pro původně zamýšlený účel. Získané výstupy z procesu validace jsou zaznamenány ve validačním protokolu, který musí mimo jiné obsahovat limitace dané metody a její robustnost.

Z tohoto důvodu existuje široké spektrum validačních norem, podle kterých je možné se řídit. Pro analýzu látek v biologických typech matric jsou nejčastěji využívány Doporučené postupy pro validaci bioanalytických metod od amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, United States Food and Drug Administration), od Evropské lékové agentury (EMA, European Medicines Agency) a od Mezinárodní rady pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčiva (ICH M10, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). ICH M10 se snaží spojit dokumenty FDA a EMA a kombinovat výhody obou směrnic a rozšířit chybějící doporučení [189–192]. Nicméně, vždy je potřeba definovat optimální postup pro specifickou oblast zaměření. Mezi základní validační parametry patří přesnost, preciznost, linearita,

selektivita, meze detekce a stanovitelnosti, robustnost, výtěžnost a stabilita analytů v zásobních roztocích nebo biologických matricích.

Při validaci bioanalytických metod v komplexních biologických matricích jsou často patrné interference z matrice vzorku. Vzhledem k nedostupnosti blankových matric a požadavku na stanovení stopových koncentrací endogenních látek jsou významným problémem nezanedbatelné matricové efekty (ME) [193–195].



## 4. KOMENTÁŘE K EXPERIMENTÁLNÍM VÝSTUPŮM S DISERTAČNÍ PRACÍ SOUVISEJÍCÍCH

### 4.1 Rešeršní práce: Neinvazivní stanovení kyseliny močové ve slinách v diagnostice vážných onemocnění

**Příloha 1:** Non-invasive determination of uric acid in human saliva in diagnosis of serious disorders

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Bohuslav Melichar, František Švec

*Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2020, 59 (5), 797–812

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 8,490 (Q1); Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 1,205 (Q1)

Kyselina močová (UA) je konečným produktem purinového metabolismu v lidském organismu. Nadbytečná akumulace UA v biologických tekutinách jako je sérum, plazma a moč může vést k typu artritidy známé jako dna, která je charakterizována tvorbou krystalů urátu sodného v kloubech, synoviální tekutině a jiných tkáních. Vysoké hladiny UA jsou také důsledkem geneticky podmíněných defektů jako je Lesch-Nyhanův syndrom [61]. UA je významným antioxidantem krevní plazmy, kde představuje více než 70 % z celkové antioxidační kapacity. Dále se na antioxidační kapacitě podílejí plazmatické proteiny (10–50 %), askorbát (do 24 %) a alfa-tokoferol (5–10 %) [196].

V rámci této rešeršní práce byl popsán význam UA ve slinách v různých klinických studiích. Velká část článku je věnována metodám odběru slin, jsou diskutovány různé přístupy a možné limitace stanovení analytů v tomto typu biologického materiálu. Další část se zabývá úpravou vzorku a následnou analýzou. Podrobně jsou rozebírána chromatografická a kapilárně elektroforetická stanovení, enzymatické a optické instrumentální metody a stanovení pomocí biosenzorů. U jednotlivých typů stanovení jsou uvedeny jejich výhody a nevýhody a také běžně aplikované podmínky. Většina HPLC metod využívá pro stanovení slinných hladin UA reverzní mód

ve spojení s ED, které je velmi selektivní a citlivé pro UA. CE metody nejběžněji využívají mobilitu záporně nabitě UA při nízkém pH ve spojení také s ED.

Druhá část článku je věnována aplikacím pomocí enzymaticko-optických metod a biosenzorů. Enzymaticko-optické metody patří mezi nejrozšířenější metody stanovení UA ve slinách. Hlavními výhodami jsou jednoduchost, vysoká rychlost, nenáročnost na složitý hardware a komerční dostupnost. Bohužel některé z těchto testů trpí nedostatečnou citlivostí a selektivitou. Biosenzory představují nový směr pro stanovení UA ve slinách, který má velký potenciál uplatnění v klinickém výzkumu. Jedná se o přenosná zařízení, která jsou stabilní, robustní a biokompatibilní, proto mohou sloužit pro provádění měření a testů přímo u lůžka pacienta. Výhodné je zejména jejich využití pro stanovení ze slin jako neinvazivně odebraného materiálu.

Závěrem rešeršní práce bylo získání doporučených postupů pro odběr slin, extrakci vzorku a stanovení UA ve slinách, které byly zohledněny v samotné experimentální práci Vernerová et al. (Příloha 2).



## 4.2 Stanovení markerů aktivace imunitního systému a kyseliny močové ve slinách

**Příloha 2:** Chromatographic method for determination of inflammatory biomarkers and uric acid in human saliva

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová, Ondřej Strouhal, Adam Kašparovský, Bohuslav Melichar, František Švec

*Talanta*, 2021, 233, 122598

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 6,556 (Q1); Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,764 (Q1)

### 4.2.1 Úvod a cíl práce

Analýza neopterinu, kynureninu a tryptofanu jako časných biomarkerů zánětu slouží k predikci řady onemocnění, včetně infekčních, autoimunitních, maligních nebo i u kardiovaskulární poruch [197, 198]. Jejich zvýšené hladiny v raných stádiích onemocnění tak mohou umožnit časnou diagnostiku s následnou terapií [32, 199, 200]. Dalším důležitým analytem představující konečný produkt metabolismu purinů je kyselina močová, která je považována za významný ukazatel antioxidační aktivity v lidském organismu [200].

V této studii byl kladen důraz na využití nové metody k vedlejších účinků onkologické léčby, jako je mukositivity. Včasná detekce a rychlá léčba mukositivity by mohla zabránit hospitalizaci pacienta nebo přerušení radioterapie a/nebo chemoterapie. Mukositivity je spojena s lokální imunitní a zánětlivou odpovědí a tím i se zvýšením hladin neopterinu a kynureninu ve slinách, které jsou doprovázeny snížením hladin tryptofanu. Právě tyto látky mají potenciál pro posouzení aktivity a závažnosti orálního zánětu a také sledování účinnosti léčby nejen u onkologických pacientů, ale také i u pacientů s parodontitidou. Z předešlých studií je známo, že imunitní odpověď hostitele na bakteriální infekci hraje klíčovou roli v destrukci tkáně u parodontitidy. Neopterin je biomarker aktivace buněčné složky imunitního systému, INF- $\gamma$  a oxidačního stresu. INF- $\gamma$  aktivuje makrofágy, které syntetizují kyslíkové radikály a řadu hydrolytických enzymů. Typickým příkladem je u parodontitidy intenzivně zkoumaná, matrixová metaloproteináza-8 degradující kolagen. Uvolněné enzymy tedy degradují extracelulární matrix tkání a podílejí se tak na její destrukci [201, 202].

Kynurenin je prvním stabilním metabolitem tryptofanu v tzv. kynureninové metabolické dráze. Ta je zodpovědná za metabolismus více než 90 % tryptofanu a podílí se na syntéze NADH, koenzymu řady redoxních reakcí. Kynurenin, respektive jeho metabolity syntetizované buňkami imunitního systému, mají výrazné imunospresivní a imunomodulační účinky. Na principu negativní zpětné vazby se podílejí na regulaci zánětlivé imunitní odpovědi [203].

Během posledních let získalo použití slin jako diagnostického biologického materiálu značnou pozornost. Hlavními výhodami slin je jejich neinvazivní odběr a jednoduchost jeho provedení bez přítomnosti zdravotnického personálu a dalšího vybavení.

Hlavním cílem práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro stanovení neopterinu, tryptofanu, kreatininu, kyseliny močové a kynureninu ve slinách s využitím HPLC a s tím spojeným odběrem a úpravou vzorků pro analýzu. Dalším cílem bylo nalézt rychlou a jednoduchou extrakční techniku, která bude využitelná pro velké série vzorků, a zároveň také otestovat aplikovatelnost metody v klinickém výzkumu na reálných vzorcích.

## **4.2.2 Výsledky a diskuze**

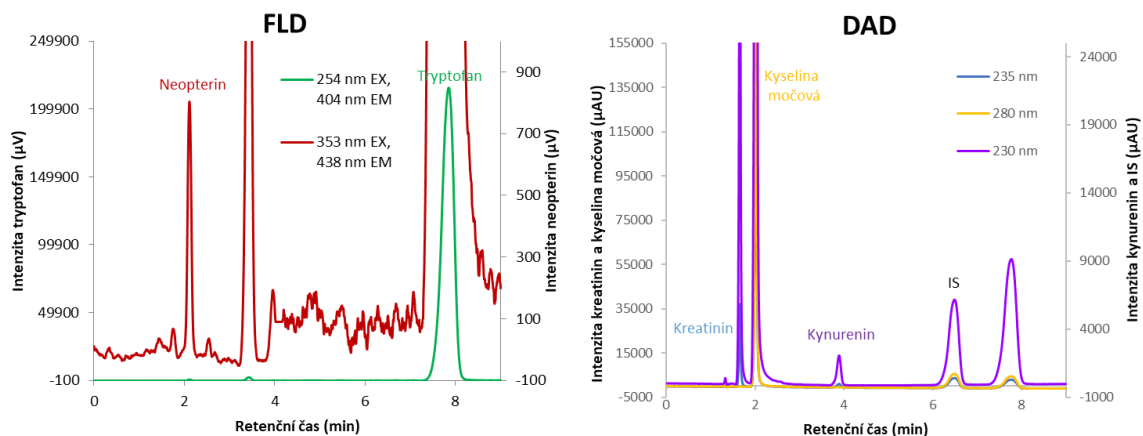
### **4.2.2.1 Úprava vzorku před analýzou**

Sliny byly odebrány pacientům Onkologické kliniky FN Olomouc a Stomatologické kliniky FN Hradec Králové. Výzkumný záměr byl schválen etickou komisí (No. 201711S10P a No. 201909S13R) a informovaný souhlas byl získán od každého subjektu zahrnutého do studie. Vzorky, získané stimulovanou metodou žvýkáním bavlněného válečku, byly okamžitě po transportu do laboratoře uskladněny při - 80 °C. Během vývoje extrakční metodiky byly testovány jednoduché způsoby úpravy vzorku pomocí filtrace, ředění, PP a následné centrifugace nebo kombinace těchto technik. K PP bylo využito různých organických rozpouštědel, kyselin a anorganických solí, avšak nebyla dosažena požadovaná citlivost detekce. Důvodem bylo naředění vzorku během procesu extrakce. Proto byly dále testovány filtrační metody. V rámci testování filtrační techniky byly porovnávány dva typy komerčně dostupných centrifugačních filtrů. Ultrafree-MC filtry (Merck, Darmstadt, Německo)

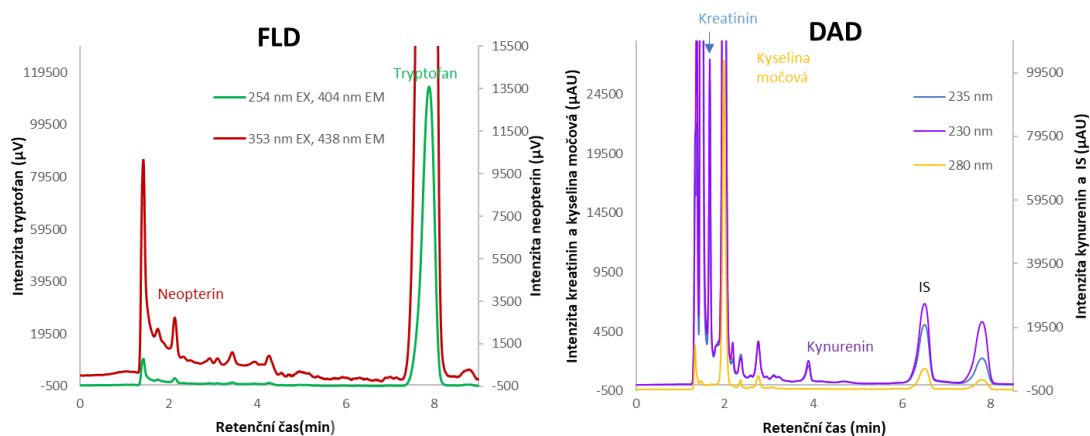
obsahují membránu z polyvinylidendifluoridu, která nebyla vhodná pro dostatečnou eliminaci balastních látek ze slin. Proto jsme zvolili Microcon filtry (Merck, Darmstadt, Německo) tvořené membránou z regenerované celulózy, jejichž eliminační vlastnosti byly dostatečné. Po výběru vhodného centrifugačního filtru a optimalizaci postupu byly nastaveny optimální extrakční podmínky: Centrifugační zkumavky s filtry Microcon byly nejdříve aktivovány 50  $\mu$ l 15 mmol/l fosfátového pufru pomocí centrifugace (14 100  $\times$  g, 15 min, 4  $^{\circ}$ C), poté naplněny 200  $\mu$ l slin s 5  $\mu$ l IS (3-nitro-L-tyrosin) o koncentraci 50  $\mu$ mol/l spolu s 3  $\mu$ l 0,5 mmol/l hydroxidem sodným. Po smíchání a protřepání na vortexu byla směs centrifugována (14 100  $\times$  g, 60 min, 4  $^{\circ}$ C). Po centrifugaci byl supernatant přenesen do mikrotitrační destičky k následné HPLC analýze.

#### 4.2.2.2 Chromatografické podmínky

Separace cílových analytů byla provedena na přístroji HPLC Prominence LC-20 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) složeného z degaseru, dvou pump, autosampleru, kolonového termostatu, DAD (SPD-M20A, Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a FLD (RF-10AXL, Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Při vývoji metody bylo testováno několik stacionárních fází s plně a povrchově porézními částicemi nebo monolitickým sorbentem v reverzním a HILIC módu. Jako mobilní fáze byly zkoušeny citrátový a fosfátový pufr o různé koncentraci (5–15 mmol/l) a pH (2,5–6), a to jak v izokratické, tak v gradientové eluci v kombinaci s acetonitrilem (1–10 %). Finální separace byla dosažena na koloně C18 Chromolith (150 mm  $\times$  4,6 mm) s předkolonou se stejnou stacionární fází (10 mm  $\times$  4,6 mm) (Merck, Darmstadt, Německo), která byla temperována na 40  $^{\circ}$ C. Mobilní fáze byla složena z 15 mmol/l fosfátového pufru o pH 4,75 při měnícím se průtoku 1,5 (0–3,9 min) až 2,5 ml/min (4–9 min). Objem nástřiku na kolonu byl 15  $\mu$ l vzorku z mikrotitrační destičky. K ovládání přístroje byl použit software LabSolution (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Separace standardních roztoků a vzorků slin za uvedených podmínek je zobrazena na Obr. 37 a 38.



Obr. 37 Separace standardních roztoků neopterinu, tryptofanu, kreatininu, kyseliny močové, kynureninu a IS (3-nitro-L-tyrosin) pomocí fluorescenční detekce (FLD, vlevo) a detektoru s diodovým polem (DAD, vpravo). Podmínky separace: stacionární fáze: Chromolith High Resolution, RP-18e, 150 × 4,6 mm, mobilní fáze: 15 mmol/l fosfátový pufr o pH 4,75, průtok: 1,5 -> 2,5 ml/min, teplota: 40 °C, objem nástřiku: 15 µl, celková doba separace: 9 min, koncentrace roztoků standardních látek: neopterin 2,5 nmol/l, tryptofan 65 µmol/l, kreatinin 50 µmol/l, kyselina močová 200 µmol/l, kynurenin 2,2 µmol/l a IS (3-nitro-L-tyrosin) 50 µmol/l



Obr. 38 Separace analytů v reálném vzorku lidských slin onkologického pacienta pomocí fluorescenční detekce (FLD, vlevo) a detektoru s diodovým polem (DAD, vpravo). Podmínky separace: viz Obr.38

#### 4.2.2.3 Validace metody

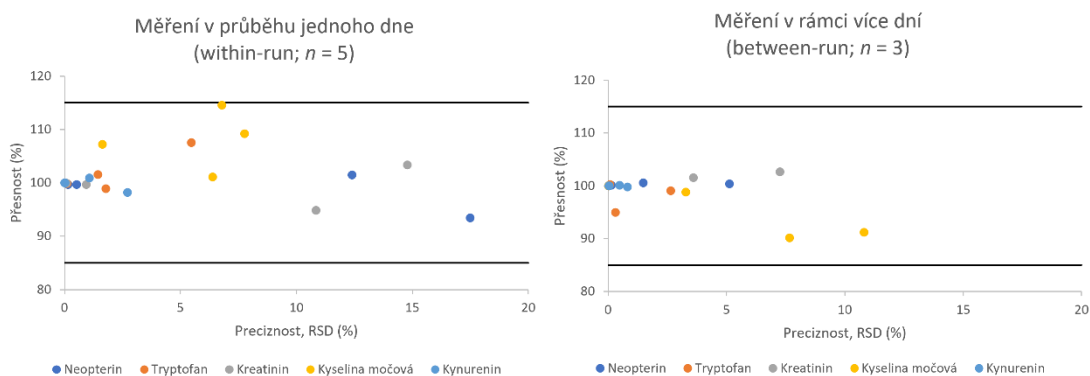
Vyvinutá metoda byla validována dle doporučených postupů EMA a ICH M10, které jsou určeny pro validace metod v oblasti bioanalýzy [189, 191]. Během validace byla vyhodnocena opakovatelnost, přesnost, preciznost, linearita, selektivita a robustnost metody. Vzorky kontrol byly přichystány přidavkem standardních látek neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v určité koncentraci do slin. Z důvodu stanovení

fyzilogicky se vyskytujících látek ve slinách byla problémem absence blankové matrice. Z tohoto důvodu bylo nutné vždy odečíst původní hladiny analytů od přídavek standardů. Výsledky validace jsou shrnuty v Tab. 3 a Obr. 39.

Tab. 3 Vybrané parametry testu vhodnosti systému, limity a kalibrační rozmezí

Analyty	Neopterin	Tryptofan	Kreatinin	Kyselina močová	Kynurenin
Rozlišení ( $R_D$ )	2,4	11,8	2,3	1,1	6,7
Účinnost kolony ( $N/m$ )	5320	14773	2180	5047	22347
Faktor symetrie ( $T$ )	0,9	0,8	1,1	0,9	0,7
*Opakovatelnost nástřiku (% RSD, STD)	1,48	1,16	0,30	0,56	0,50
*Opakovatelnost nástřiku (% RSD, BIO), level 1	4,76	0,51	0,68	0,45	1,54
*Opakovatelnost nástřiku (% RSD, BIO), level 2	2,56	1,88	0,24	0,31	1,24
Kalibrační rozmezí ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,60–100 $\times 10^{-3}$	0,73–200	0,12–200	0,18–400	0,14–40
Korelační koeficient	0,999	0,997	0,999	0,997	0,999
Mez detekce, (LOD, $\mu\text{mol/l}$ )	0,36 $\times 10^{-3}$	0,44	0,07	0,11	0,08

STD – roztok standardů; BIO – biologický materiál; RSD – relativní směrodatná odchylka plochy pod píkem; LOD – mez detekce; \* $n$  – počet opakování = 6; level 1: neopterin 0,6 nmol/l, tryptofan 0,73  $\mu\text{mol/l}$ , kreatinin 0,13  $\mu\text{mol/l}$ , kyselina močová 0,18  $\mu\text{mol/l}$ , kynurenin 0,14  $\mu\text{mol/l}$ ; level 2: neopterin 1,8 nmol/l, tryptofan 2,18  $\mu\text{mol/l}$ , kreatinin 0,39  $\mu\text{mol/l}$ , kyselina močová 0,54  $\mu\text{mol/l}$ , kynurenin 0,41  $\mu\text{mol/l}$



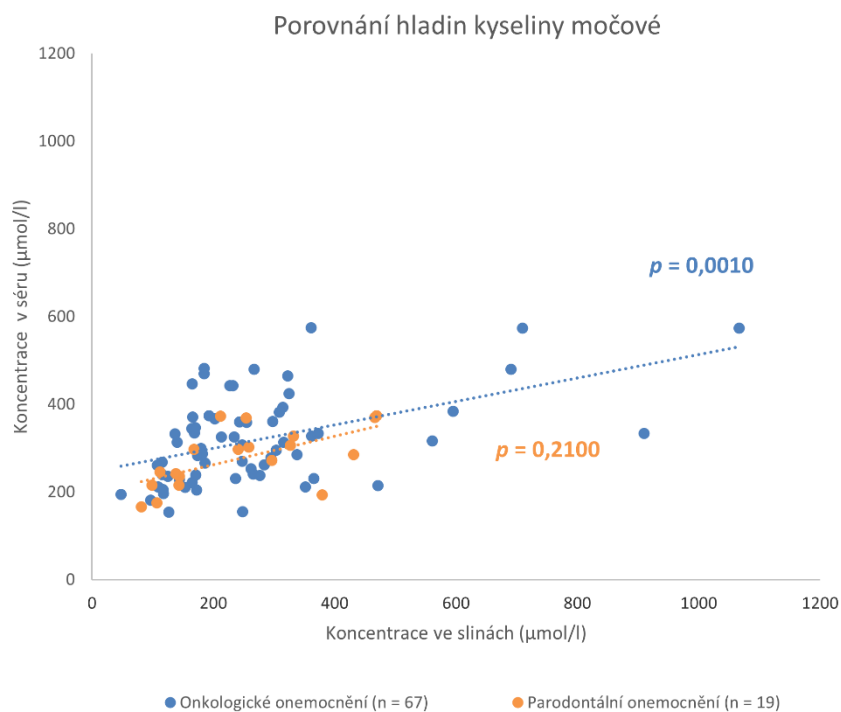
Obr. 39 Výsledky preciznosti a přesnosti HPLC metody na čtyřech hladinách kontrolních vzorků.  $n$  – počet opakování; RSD – relativní směrodatná odchylka plochy pod píkem

V rámci validace byla testována také dlouhodobá stabilita analytů v biologickém materiálu. Ta potvrdila možnost skladování vzorků při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po požadovanou dobu jednoho měsíce.

#### 4.2.2.4 Aplikace metody

Nově vyvinutá metoda byla aplikována při stanovení cílových analytů ve slinách od pacientů s onkologickým a parodontologickým onemocněním. První skupinu tvořilo 67 pacientů s různými typy nádorů (karcinom prsu, ledvin, oropharyngu a tlustého střeva). Druhá skupina zahrnovala 19 pacientů s parodontitidou. Ve vyhodnocení získaných dat byl kladen důraz na porovnání hladin kyseliny močové (UA) ve slinách a séru ke zjištění možné korelace mezi nimi. Sérové koncentrace UA byly stanoveny pomocí rutinní biochemické analýzy na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky ve FN Hradec Králové a jejich porovnání s hladinami ve slinách je zobrazeno na Obr. 40 u obou sledovaných kohort pacientů. I přesto, že u pacientů s nádorovým onemocněním byly pozorovány významně nižší koncentrace UA ve slinách než v séru ( $p = 0,0010$ ), byla nalezena středně silná korelace mezi těmito typy biologických materiálů ( $r_s = 0,44, p = 0,0002$ ). U pacientů s parodontálním onemocněním koncentrace UA v séru a slinách byly statisticky významně odlišné ( $r_s = 0,66, p = 0,0020$ ). Při sledování ostatních markerů zánětu byly nalezeny významně vyšší hodnoty poměrů neopterin/kreatinin, kynurenin/tryptofan a kynurenin/kreatinin ve slinách než v séru, zatímco poměr tryptofan/kynurenin byl významně nižší, což signalizuje zvýšenou imunitní aktivaci v dutině ústní. Na základě

všech našich výsledků bylo ověřeno, že nová metoda splňuje požadavky citlivosti, a tím pádem je vhodná pro analýzu markerů zánětu a UA ve slinách.



Obr. 40 Porovnání hladin UA ve slinách a v séru u pacientů s onkologickým a parodontálním onemocněním. *n* – počet pacientů

### 4.2.3 Shrnutí

V rámci rozsáhlé pilotní studie byla vyvinuta a plně validována nová bioanalytická HPLC-DAD-FLD metoda pro stanovení neopterinu, tryptofanu, kreatininu, kynureninu a kyseliny močové ve slinách. Separace analytů byla dosažena pomocí monolitické stacionární fáze, která byla vhodná pro stanovení látek ve velkých sériích vzorků. Jako metoda úpravy vzorku byla zvolena jednoduchá a rychlá filtrace pomocí Microcon centrifugačních filtrů. Pro kvantifikaci byla využita metoda vnitřního standardu. Analýzou 86 reálných vzorků slin od pacientů bylo verifikováno, že navržená metoda může být použita v klinickém výzkumu a následné praxi především jako méně invazivní alternativa ke stanovení zejména UA v séru v porovnání s rutinní analýzou.





### 4.3 UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení markerů aktivace imunitního systému v gingivální tekutině

**Příloha 3:** Liquid chromatography method with tandem mass spectrometry and fluorescence detection for determination of inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid as a tool for diagnosis of periodontal disease

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová, František Švec

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 212, 114644

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 3,571 (Q2/Q3); Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,515 (Q2)

#### 4.3.1 Úvod a cíl práce

Mezi nejčastější choroby lidské populace patří zánětlivá onemocnění parodontu (gingivitida a parodontitida). Původcem těchto onemocnění jsou bakterie dentálního mikrobiálního povlaku. Imunitní odpověď hostitele namířená proti těmto patogenům a jejich produktům vede k zánětu dásní (gingivitida) a také může být příčinou resorpce alveolární kosti (parodontitida) [23]. Tento proces je spojen s uvolňováním mediátorů zánětlivé odpovědi a jejich produktů do gingivální tekutiny (GCF). GCF je transudát nebo exsudát krevní plazmy v závislosti na úrovni zánětu parodontální tkáně, který se vylučuje dásňovým žlábkem/parodontálním chobotem [21].

Analýza GCF poskytuje informaci o aktuální úrovni zánětu přímo v místě odběru. Stanovení zánětlivých biomarkerů v GCF má tedy velký potenciál využití v diagnostice, hodnocení léčby a progresi onemocnění parodontu.

Mezi běžná klinická vyšetření parodontu patří hodnocení hloubky parodontálních chobotů, krvácivost po sondáži, či gingivální index. Tyto metody však nejsou velmi spolehlivé a specifické pro hodnocení míry zánětu. Z tohoto důvodu bylo hlavním cílem studie vyvinout citlivou a selektivní metodu pro stanovení biomarkerů aktivace imunitního systému (neopterin, tryptofan a kynurenin) a kreatininu v GCF. Dílčími cíli bylo optimalizovat odběr vzorku GCF pro kvantitativní vyhodnocení výsledných dat a aplikovat vyvinutou metodu na reálné vzorky pacientů s parodontálním onemocněním a zdravých dárců.

## 4.3.2 Výsledky a diskuze

### 4.3.2.1 Úprava vzorku před analýzou

V první části vývoje metody byly testovány různé způsoby odběru GCF, které zahrnovaly odběr pomocí papírového čepu, kalibrované mikrokapiláry a retrakčního vlákna. Během optimalizace odběru byl kladen důraz na reprodukovatelnost a kvantifikaci výsledných dat. Nejlepších výsledků bylo docíleno pomocí retrakčního vlákna. Odběr GCF od pacientů s parodontitidou a zdravých dárců proběhl na Stomatologické klinice FN Hradec Králové. Všichni účastníci byli obeznámeni s účelem studie a potvrdili podpisem informovaný souhlas, který byl schválen Etickou komisí FN Hradec Králové (No. 201909S13R). Po odběru byly vzorky transportovány do laboratoře ke zpracování a následné kvantifikaci. Z retrakčního vlákna byla GCF uvolněna sonikací v ultrazvukové lázni (20 °C, 20 min.) do 110 µl fyziologického roztoku (0,9% NaCl). Po sonikaci byly vzorky uchovány při 4 °C po dobu 1 hod, následně byla vlákna odstraněna ze zkumavek a získané extrakty zamrazeny (-80 °C) a analyzovány v čase potřeby.

Vývoj extrakčního postupu byl zaměřen na jednoduché způsoby úpravy pomocí filtrace, PP a následné centrifugace nebo kombinace těchto technik. Testování PP vyžadovalo další naředění vzorku, které vedlo ke ztrátě citlivosti v malém množství GCF. PP tedy musela být vyloučena. Nicméně použitím samotné filtrace nedocházelo k dostatečnému přečištění vzorku. Z tohoto důvodu byly využity Microcon (Merck, Darmstadt, Německo) centrifugační filtry bez nutnosti dalšího naředění vzorku. Finální extrakce zahrnovala nejprve aktivaci filtru 50 µl pufru octanu amonného (AmAc, 5 mmol/l) centrifugací při 14 100 × g, 4 °C po dobu 15 minut. Poté byly centrifugační zkumavky s filtry Microcon naplněny 100 µl GCF a 5 µl roztoku IS (L-tryptofan-(*indole-d5*)) o koncentraci 1500 µmol/l. Po smíchání a protřepání na vortexu byla směs centrifugována (14 100 × g, 30 min, 4 °C). Následně byl supernatant přenesen do mikrotitrační destičky k chromatografické analýze.

### 4.3.2.2 Chromatografické podmínky

Metoda byla vyvíjena na UHPLC systému Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) složeného z degaseru, dvou pump, autosampleru, kolonového termostatu, FLD

(RF-20A, Shimadzu, Kyoto, Japonsko), MS (LCMS 8030, Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a počítačového softwaru (Labsolutions).

Při optimalizaci bylo prvním cílem nalézt vhodné MS/MS podmínky pro cílové látky, optimalizace proběhla pomocí softwaru LabSolutions s automatickým programem. Přehled finálních detekovaných podmínek je uveden v Tab. 4. Během vývoje metody nebylo dosaženo požadované citlivosti pomocí MS pro neopterin. Z tohoto důvodu byla použita FLD, která umožnila kvantifikaci hladin pod 2 nmol/l. Neopterin byl detekován při excitační vlnové délce 353 nm a emisní 438 nm. V rámci optimalizace separačních podmínek bylo vyzkoušeno několik stacionárních fází v kombinaci s různým složením mobilní fáze, pH, koncentrace kyseliny mravenčí atd. Byla testována řada kolon s povrchově porézními částicemi (všechny Phenomenex, Torrance, USA), např.: HILIC (150 × 3 mm, 2,6 μm; 100 × 2 mm 1,7 μm, 100 Å), Polar C18 (100 × 4,6 mm, 2,6 μm, 100 Å) nebo PFP (100 × 3 mm, 1,7 μm, 100 Å) a také Acquity UPLC BEH Amide (150 × 3 mm, 1,7 μm, 130 Å, Waters, Milford, MA, USA). Při testování mobilní fáze byly využity kombinace vody, methanolu, acetonitrilu, pufru mravenčanu amonného (AmFo), octatu amonného (AmAc) a hydrogenuhličitanu o odlišné koncentraci a pH.

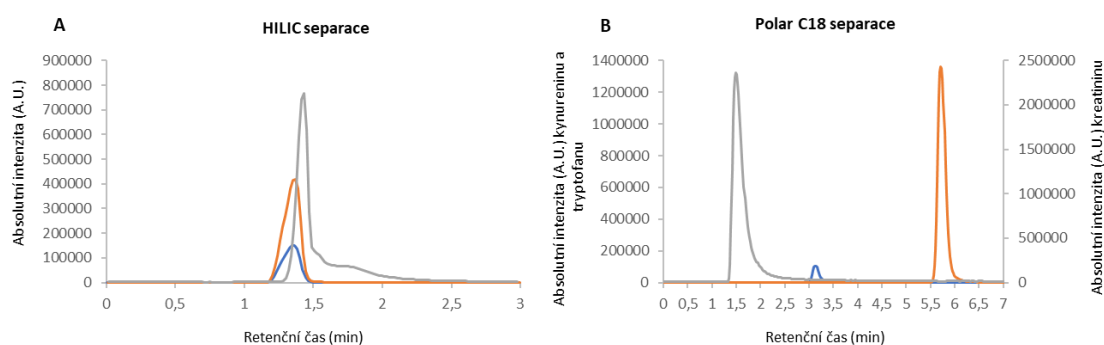
Tab 4. Optimalizované MRM přechody pro kreatinin, kynurenin, tryptofan a IS (L-tryptofan-(*indole-d<sub>5</sub>*)). Čas prodlevy byl nastaven na 50 ms.

	Prekurzorové ionty ( <i>m/z</i> )	Produktové ionty ( <i>m/z</i> )	Q1 (V)	CE	Q3 (V)
Kreatinin	114,00	44,00	-15	-19	-15
	114,00	86,00	-15	-19	-15
Kynurenin	208,80	191,85	-10	-9	-26
	208,80	94,00	-10	-15	-10
	208,80	146,00	-14	-22	-16
IS (L-tryptofan-( <i>indole-d<sub>5</sub></i> ))	204,90	145,85	-14	-16	-16
	204,90	117,90	-10	-24	-27
Tryptofan	210,05	191,80	-14	-12	-14
	210,05	149,95	-30	-18	-20
	210,05	193,10	-10	-10	-27

Q1 – kvadrupól 1; Q3 – kvadrupól 3; CE – kolizní energie

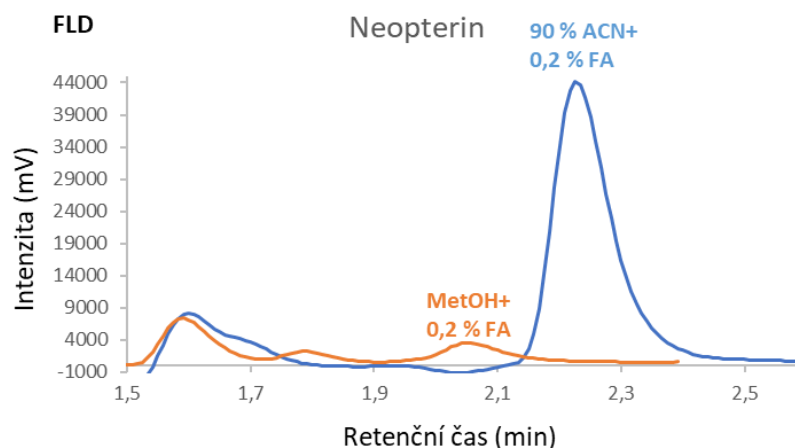
Neopterin a kreatinin jsou velmi polární látky obecně málo zadržované na reverzních fázích. Proto jsme během vývoje chromatografie testovali fázi HILIC. Bohužel nebylo dosaženo optimální separace díky vysokému šumu na základní linii a dlouhé době

potřebné k ekvilibraci systému. Následně pro optimalizaci konečných separačních podmínek byla zvolena kolona Polar C18 (100 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm, 100 Å), jelikož poskytovala nejlepší retenční vlastnosti pro všechny cílové analyty. Dalším krokem byla optimalizace složek mobilní fáze. První byly testovány vodné pufrы (AmAc a AmFo) o různé koncentraci a pH, a to v izokratické a následně v gradientové eluci s organickým rozpouštědlem. AmAc pufr o koncentraci 5 mmol/l byl vybrán jako nejvhodnější pro cílové látky. Porovnání nejlépe dosažených výsledků pomocí HILIC a C18 separace je ukázáno na Obr. 41.



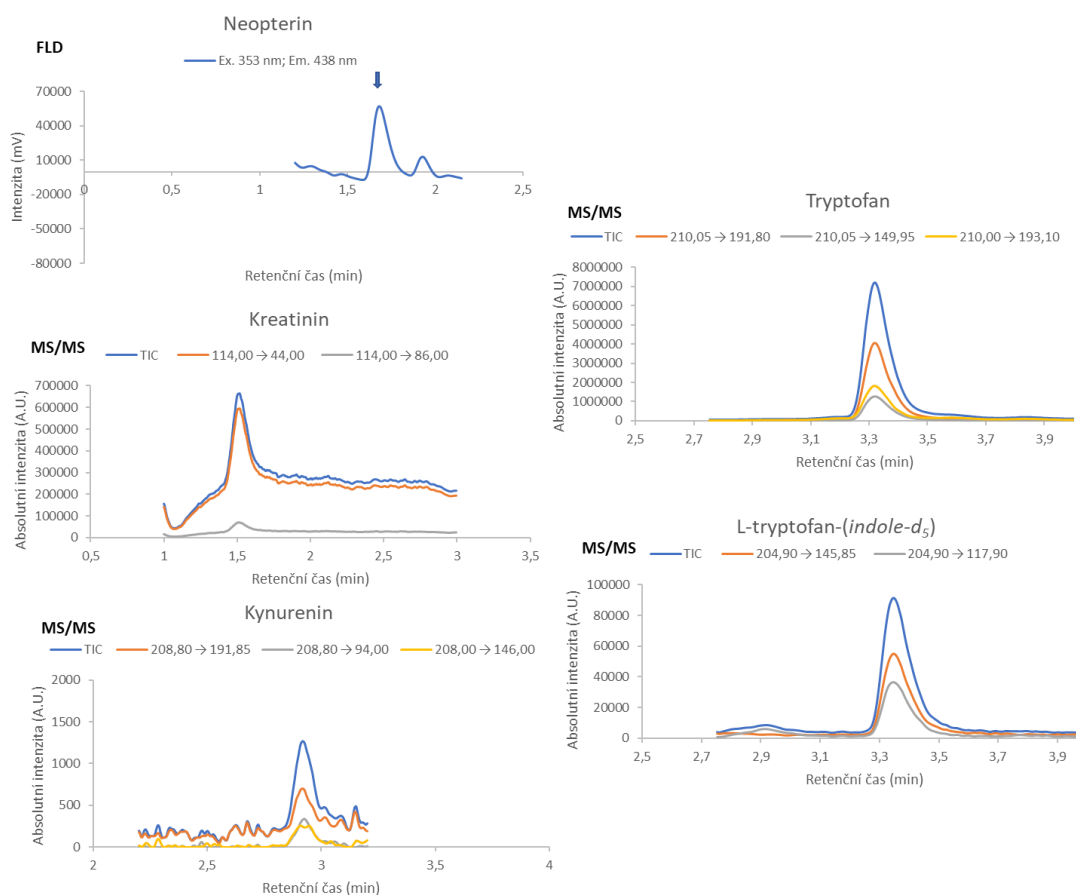
Obr. 41 Porovnání separace tryptofanu (oranžová), kreatininu (šedá) a kynureninu (modrá) pomocí dvou mechanismů separace: (A) HILIC a (B) reverzní fáze. Podmínky HILIC separace: stacionární fáze: Kinetex HILIC, 100 × 2 mm, 1,7 μm, 100 Å; mobilní fáze: acetonitril a 5 mmol/l AmAc (70:30, v/v) o pH 6, průtok: 0,3 ml/min, teplota: 40 °C, objem nástřiku: 1 μl. Podmínky separace na reverzní fázi (C18): stacionární fáze: Kinetex Polar C18, 100 × 3 mm, 2,6 μm, 100 Å, mobilní fáze: složka A – 5 mmol/l AmAc o pH 6, složka B – 0,2 % kyseliny mravenčí v acetonitrilu s LC-MS vodou (90:10, v/v), lineární gradient 0–10 % složky B (1–3,5 min), průtok: 0,5 ml/min, teplota: 40 °C, objem nástřiku: 8 μl, celková doba separace: 4,5 min. Koncentrace roztoků standardních látek: tryptofan 65 μmol/l, kreatinin 50 μmol/l, kynurenin 2,2 μmol/l, MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

V poslední řadě byl testován vliv složky B mobilní fáze při gradientové eluci na separaci látek. Jako složka B byly testovány acetonitril a methanol s přidavkem 0,2 % kyseliny mravenčí. Při použití methanolu docházelo ke snížení odezvy píku neopterinu oproti gradientu s acetonitrilem (Obr. 42). Z tohoto důvodu byl použit acetonitril s příměsí 10 % LC-MS vody ke zvýšení retence.



Obr. 42 Vliv organického rozpouštědla v průběhu gradientové eluce na pík neopterinu. Podmínky separace: stacionární fáze: Kinetex Polar C18, 100 × 3 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , mobilní fáze: složka A – 5 mmol/l AmAc o pH 6, složka B – 0,2 % kyseliny mravenčí v acetonitrilu (ACN, modrá) a v methanolu (MeOH, oranžová), lineární gradient 0–10 % složky B (1–3,5 min), průtok: 0,5 ml/min, teplota: 40 °C, objem nástřiku: 8  $\mu\text{l}$ , celková doba separace: 4,5 min, koncentrace standardního roztoku neopterinu: 2,5 nmol/l, FLD – fluorescenční detekce

Finální separace byla dosažena na koloně Polar C18 (100 × 3 mm, velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) s předkolonou se stejnou stacionární fází při 40 °C. Mobilní fáze byla tvořena z 5 mmol/l AmAc pufru o pH 6 a 0,2 % kyseliny mravenčí v acetonitrilu v gradientové eluci 0–10 % při průtoku 0,5 ml/min. Objem nástřiku na kolonu byl 8  $\mu\text{l}$ . Celková doba chromatografické analýzy včetně ekvilibrace kolony byla 4,5 minuty. Separace GCF za vymezených podmínek je uvedena na Obr. 43.



Obr. 43 Separace cílových analytů v GCF vzorku pacienta s parodontálním onemocněním. Podmínky separace: stacionární fáze: Kinetex Polar C18, 100 x 3 mm, 2,6 um, 100 Å, mobilní fáze: složka A – 5 mmol/l AmAc o pH 6, složka B – 0,2 % kyseliny mravenčí v acetonitrilu s LC-MS vodou (90:10, v/v), lineární gradient 0–10 % složky B (1–3,5 min), průtok: 0,5 ml/min, teplota: 40 °C, objem nástřiku: 8 µl, celková doba separace: 4,5 min, FLD – fluorescenční detekce, MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie. Pomocí metody celkového iontového proudu (TIC) byla provedena kvantifikace látek.

#### 4.3.2.3 Validace metody

Validace nově vyvinuté metody proběhla dle EMA a ICH M10 [189, 191]. ICH M10 bylo použito pro vyhodnocení testu vhodnosti chromatografické systému a EMA pro ostatní validační parametry, jako jsou přesnost, preciznost, selektivita, linearita a robustnost metody. Pro všechny analyty a IS (L-tryptofan-(indole-d<sub>5</sub>)) byly vyhodnoceny ME dle metody postextrakčního přidavku. ME byly kompenzovány použitím značeného IS. Vzorky kontrol byly připraveny přidavkem standardních látek neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v určité koncentraci do GCF. Z důvodu stanovení endogenních látek v GCF byla problémem chybějící blanková

matrice. Dlouhodobá stabilita analytů v biologickém materiálu byla testována po dobu čtyř měsíců při teplotách 4 °C, -25 °C a -80 °C. Výsledky validace shrnuje Tab. 5, 6 a 7 a Obr. 44.

Tab.5 Výsledky testu vhodnosti chromatografického systému a kalibrační rozmezí

Analyt	Neopterin	Kreatinin	Kynurenin	Tryptofan
Kalibrační rozmezí (μmol/l)	0,5×10 <sup>-3</sup> –100	0,2–20	0,1–40	0,2–200
Korelační koeficient ( <i>r</i> <sup>2</sup> )	0,997	0,999	0,998	0,999
Kapacita píku ( <i>P<sub>c</sub></i> )	122,36	126,00	115,68	146,35
*Opakovatelnost nástřiku (% RSD, STD)	1,52	1,08	4,94	4,63
*Opakovatelnost nástřiku (% RSD, BIO)	2,06	4,30	1,37	3,16

STD – standardní roztok; BIO – biologický materiál; RSD – relativní směrodatná odchylka plochy píku;

\**n* – počet opakování = 6

Tab. 6 Přesnost a preciznost metody

	předpokládaná koncentrace	měření v průběhu jednoho dne, within-run, (n = 5)			měření v rámci více dní, between-run, (n = 3)		
		změřená koncentrace (průměr)	Preciznost (% RSD)	Přesnost (%)	změřená koncentrace (průměr)	Preciznost (% RSD)	Přesnost (%)
Neopterin (nmol/l)							
LLOQ	0,50	0,51	2,33	102,85	0,53	1,23	105,13
Nízký QC	1,50	1,52	1,01	101,26	1,52	1,30	101,56
Střední QC	30,00	30,40	0,89	101,34	30,29	1,71	100,98
Vysoký QC	70,00	70,22	0,50	100,31	70,46	0,52	100,65
Tryptofan (μmol/l)							
LLOQ	0,20	0,20	7,00	97,73	0,20	4,84	101,67
Nízký QC	1,00	0,98	7,98	97,91	1,00	2,11	100,33
Střední QC	70,00	70,01	12,04	100,02	70,46	2,71	100,65
Vysoký QC	120,00	123,42	6,04	102,85	123,91	6,40	103,26
Kreatinin (μmol/l)							
LLOQ	0,20	0,23	3,42	114,77	0,23	4,32	113,33
Nízký QC	0,60	0,68	5,53	113,79	0,62	12,19	103,89
Střední QC	2,50	2,65	4,56	106,04	2,71	7,73	108,53
Vysoký QC	10,00	10,54	3,31	105,41	10,32	2,46	103,23
Kynurenin (μmol/l)							
LLOQ	0,10	0,10	6,85	110,45	0,10	4,84	109,00
Nízký QC	1,00	1,04	7,64	103,73	0,97	2,11	96,67
Střední QC	18,00	18,50	9,95	102,77	19,68	2,71	109,33
Vysoký QC	30,00	31,24	5,44	104,12	30,57	6,40	101,89

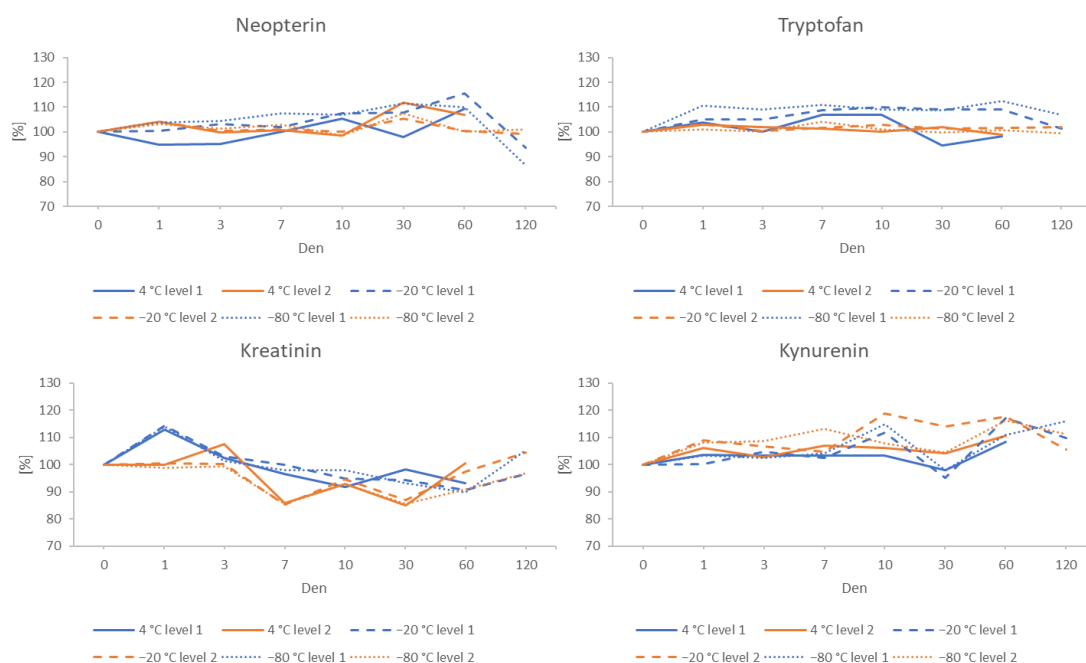
LLOQ – dolní mez stanovitelnosti; QC – kontrolní vzorek; RSD – relativní směrodatná odchylka, n – počet opakování

Tab. 7 Matricový efekt vyjádřený v procentech (ME %) pro tryptofan, kynurenin, kreatinin, neopterin a vnitřní standard

GCF vzorky		Tryptofan	Kynurenin	Kreatinin	L-tryptofan- (indole- <i>d</i> <sub>3</sub> ), IS	Neopterin
		ME %	ME %	ME %	ME %	ME %
Matrice 1	Nízký QC	100,00	97,87	114,92	86,97	96,86
	Střední QC	107,66	98,80	99,59	99,36	104,92
Matrice 2	Nízký QC	106,67	97,16	113,56	86,86	108,27
	Střední QC	100,42	109,62	105,75	96,65	97,35

ME – matricový efekt; QC – kontrolní vzorek; IS – vnitřní standard; koncentrace analytů viz Tab.6





Obr. 44 Sledovaná stabilita analytů v GCF po dobu 120 dnů při různých teplotách skladování. Koncentrace analytů viz Tab.6 (level 1 – nízký QC, level 2 – střední QC)

#### 4.3.2.4 Aplikace metody

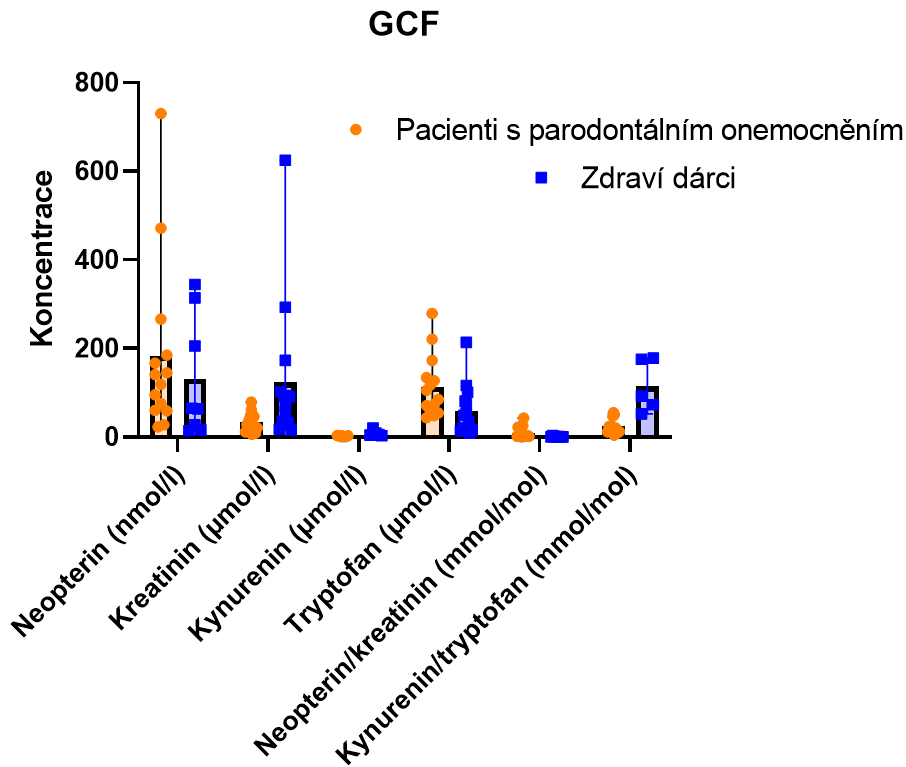
Vhodnost nové validované metody pro klinickou praxi byla ověřena stanovením cílových látek v GCF u 14 pacientů s parodontitidou a 14 zdravých dárců. Kvůli odlišnému množství GCF absorbovaného do retrakčního vlákna stanoveného pro extrakci byly konečné hodnoty vzorků převedeny na koncentraci analytů přímo v GCF dle následující rovnice:

$$C_{GCF} = C_{detGCF} \times (110 + V_{GCF}) / (V_{GCF})$$

Kde  $C_{GCF}$  je koncentrace analytu v GCF,  $C_{detGCF}$  je koncentrace detekovaná ve vzorku GCF a  $V_{GCF}$  je objem GCF.

Objem GCF byl určen na základě hmotnosti retrakčního vlákna po odběru vzorku s využitím hustoty GCF 1,0 g/ml [201]. Výsledná data od všech pacientů a dárců jsou zobrazena na Obr. 45. Koncentrace neopterinu a tryptofanu byly signifikantně vyšší u studijní skupiny ( $p < 0,001$ ). Poměr neopterin/kreatinin byl u jedinců s parodontitidou signifikantně nižší ( $p < 0,001$ ). Hodnocení poměru

kynurenin/tryptofan neprokázalo statisticky významně vyšší hladiny u pacientů s parodontitidou ( $p = 0,470$ ). Ačkoliv nová metoda je velmi citlivá, u některých vzorků od zdravých dárců byly nalezeny nízké koncentrace kynureninu pod limitem kvantifikace. Bohužel, již nebylo možné snížit poměr ředění vzorku GCF, aby byl zachován minimální objem nástříku z mikrotitrační destičky do UHPLC systému.



Obr. 45 Koncentrace neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v gingivální tekutině (GCF) u pacientů s parodontálním onemocněním a zdravých dárců. Výsledky jsou prezentovány jako průměr s rozmezím detekovaných hodnot.

### 4.3.3 Shrnutí

K posouzení zánětlivé odpovědi při onemocnění parodontu byla vyvinuta a plně validována UHPLC-FLD-MS/MS metoda pro stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v GCF. Jelikož kynurenin a tryptofan nebyly dosud hodnoceny v GCF, představuje tato metoda nové možnosti hodnocení imunitní odpovědi u parodontitidy a lepší pochopení patofyziologických procesů. Metoda byla implementována do souboru vyšetření Výzkumné laboratoře Ústavu klinické

biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové, zejména pro potřeby Stomatologické kliniky FN Hradec Králové.



## 4.4 Potenciální využití měření neopterinu ve vztahu k horečce u metastatického melanomu s cílenou kombinovanou terapií

**Příloha 4:** Potential utilization of neopterin measurements in the assessment of pyrexia in metastatic melanoma treated with combined targeted therapy: a case report

Marie Bartoušková, Michaela Hroušková, Filip Čtvrtlík, Eva Hlídková, Kateřina Kučerová, Andrea Vernerová, Bohuslav Melichar, Hana Študentová

*Pteridines*, 2020, 31 (1), 151–157

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 0,659 (Q4/Q4); Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,112 (Q4)

Laboratorní medicína tvoří nezbytnou součást managementu terapie nádorových onemocnění. Imunitní systém má nezastupitelnou roli při sledování zánětlivé odpovědi v průběhu nádorového onemocnění a jeho léčby. Změny hladin biomarkerů aktivace imunitního systému mohou velmi časně a spolehlivě reflektovat růst tumoru a jeho progresi. Je známo, že zvýšené hladiny neopterinu jsou spojené se špatnou prognózou nádorových onemocnění a k jejich vzestupu dochází také vlivem chemoterapie a radioterapie [197, 199, 204].

Tato kazuistika vznikla ve spolupráci s Onkologickou klinikou FN Olomouc a jejím cílem bylo sledovat produkci neopterinu ve spojení s horečkou jako nežádoucím účinkem kombinované léčby dabrafenibem a trametinibem u metastatického melanomu. Kombinovaná terapie je zpočátku vysoce účinná při léčbě tohoto nádoru, avšak po dlouhodobém užívání může docházet k rezistenci a k opětovné progresi onemocnění. Horečnatý stav spojený se zimnicí, nočním pocením a hypotenzí je považován za nejčastější nežádoucí účinek této kombinované terapie. Nicméně, mechanismus vyvolání horečky u tohoto typu léčby není doposud známý [205, 206].

Hladiny neopterinu v moči byly detekovány v průběhu léčby denně po dobu dvou měsíců pomocí HPLC-DAD-FLD metody [207] ve Výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové. Vzorky moče byly odebírány denně po dobu dvou měsíců od začátku terapie. V rámci studie byly také sledovány hladiny

neopterinu a C-reaktivního proteinu v séru pomocí imunoanalýzy a komerčního kitu [207, 208].

Tato studie prokazuje účinnost kombinované cílené terapie u pacienta s metastatickým melanomem, a také ilustruje využití analytického stanovení neopterinu v diagnostice a monitorování horečky u těchto pacientů. Časový průběh denních stanovení ukazuje, že po počátečním poklesu neopterinu v moči se koncentrace začaly zvyšovat, což ukazovalo na aktivaci imunitního systému. K dalšímu výraznému zvýšení neopterinu došlo týden před klinickou manifestací onemocnění, kdy také koncentrace neopterinu v moči dosáhla maximální hodnoty. Po nasazení podpůrné léčby došlo k výraznému poklesu hladin neopterinu v moči, které se však po opětovném zahájení kombinované léčby začaly znovu zvyšovat. Tento pokles indikoval neinfekční příčinu horečnatého stavu.

Závěrem lze říci, že tato kazuistika prokazuje účinnost léčby dabrafenibem a trametinibem, a také naznačuje potenciální využití denních měření neopterinu při predikci a monitorování nežádoucích účinků cílené léčby.

V rámci této studie jsem měla podíl na příjmu biologického materiálu z FN Olomouc, extrakci vzorků před analýzou a samotném stanovení hladin neopterinu a kreatininu v moči pomocí HPLC-DAD-FLD techniky.

## 4.5 Porovnání mitochondriální respirace trombocytů pomocí dvou izolačních technik: centrifugace v hustotním gradientu a diskontinuální aferézy

**Příloha 5:** Mitochondrial respiration of platelets: comparison of isolation methods

Andrea Vernerová, Luiz Felipe Garcia-Souza, Ondřej Souček, Milan Košťál, Vít Řeháček, Lenka Kujovská Krčmová, Erich Gnaiger, Ondřej Sobotka

*Biomedicines*, 2021, 9 (12), 1859

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 4,757 (Q2/Q2/Q2); Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,798 (Q2)

### 4.5.1 Úvod a cíl práce

Krevní destičky jsou subcelulární elementy krve, které významně přispívají k hemostázy vnitřního prostředí organismu. Trombocyty nemají ve své struktuře jádro, avšak obsahují jiné organely, jako jsou mitochondrie a endoplazmatické retikulum. Mitochondrie jsou klíčové buněčné organely, které jsou zodpovědné za produkci ATP, redoxní homeostázu, regulaci ROS a intracelulární koncentraci vápníku, aktivaci apoptózy a mnoho dalších funkcí [88].

Vyšetření funkce trombocytů je v hematologii opomíjené téma především pro nedostupnost vhodných metod. Zlatým standardem je dnes vyšetření optické agregometrie [209], což je metoda dostupná, ale obvykle hůře interpretovatelná a málo specifická. Znalost funkční aktivity by mohla pomoci při léčbě či profylaxi různých hematologických i metabolických onemocněních, a tím vést ke zlepšení kvality života nemocných. Mitochondriální dysfunkce trombocytů byla pozorována u několika fyziologických a patologických stavů, včetně diabetu mellitu II. typu [210], stárnutí [211], astmatu [212], sepse [213], schizofrenie, Huntingtonovy, Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby [214].

Základní mitochondriální funkce lze studovat hodnocením rychlosti spotřeby kyslíku, která souvisí s oxidací substrátů na vnitřní mitochondriální membráně a se změnou její konformace [182, 215]. Díky moderní respiometrii s vysokou senzitivitou (HRR) lze analyzovat metabolický profil a funkci trombocytů z malého vzorku žilní krve pomocí centrifugace v hustotním gradientu a diferenciální centrifugace. Nicméně

s přibývajícími daty jsou stále více diskutovány metodologické problémy tohoto vyšetření týkající se hlavně přípravy samotného vzorku a izolační procedury využitě k získání kvalitní kontroly trombocytů. Různé typy antikoagulancií, nastavení podmínek centrifugace a respirační protokoly však ovlivňují chování koncentrátů trombocytů a rychlost mitochondriálního dýchání.

Transfúze trombocytů jsou nezbytné pro léčbu různých patologických stavů a jejich léčebné výhody jsou všeobecně uznávány odbornou veřejností. Proces separace a uskladnění koncentrátů trombocytů byl již do podrobností zdokumentován a byla publikována řada doporučení v odborných časopisech [216]. Nicméně zlepšení funkce a životnosti destiček určených k transfúzi je i nadále předmětem výzkumu [217, 218].

Hlavním cílem studie bylo porovnání mitochondriálního dýchání trombocytů získaných pomocí aferézy a centrifugace v hustotním gradientu, která byla spojena s diferenciální centrifugací. Dílčím cílem bylo porovnání těchto technik z hlediska aktivace trombocytů během procesu izolace pomocí imunologických metod. V neposlední řadě bylo cílem studie získání kontrolního souboru dat mitochondriální respirace trombocytů od zdravých dobrovolníků (dárců krevních destiček) pro budoucí studie různých patologických stavů.

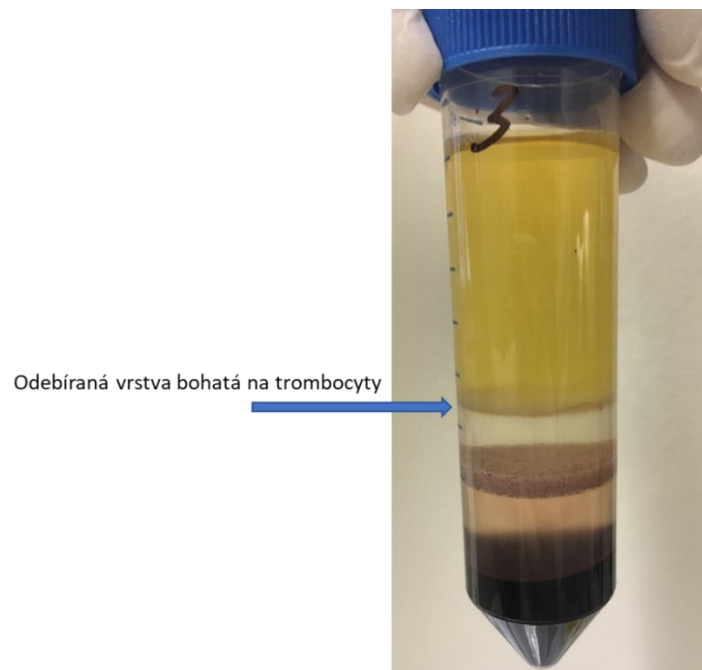
## **4.5.2 Výsledky a diskuze**

### **4.5.2.1 Izolace trombocytů**

Do studie bylo zařazeno 29 zdravých dárců krve registrovaných v databázi Transfuzního oddělení FN Hradec Králové v souladu s etickým protokolem (No. 201903511P). Od zdravých dárců krve byla nejprve odebrána krev pro izolaci trombocytů pomocí centrifugace a poté byli napojeni na aferetický přístroj pro separaci trombocytární masy. Následně byl odebrán vzorek koncentrátu trombocytů z hotového transfuzního vaku. Vzorky od jednoho dárce byly vždy zpracovány čerstvě v den odběru krve a následně podrobeny analýze mitochondriální respirace v ten samý den. Počet trombocytů byl stanoven pomocí průtokové cytometrie v Hematologické laboratoři FN Hradec Králové před izolací v plné krvi a po izolaci ve všech výtěžcích.



K získání trombocytů o vysoké kvalitě pomocí centrifugace byly využity standardní postupy dle aktuálních doporučení mezinárodní společnosti mitochondriální fyziologie [219]. Dvanáct mililitrů krve bylo využito pro izolaci trombocytů pomocí centrifugace v hustotním gradientu Ficollu ve zkumavkách Leucosep (50 ml, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Rakousko). Po odebrání vrstvy bohaté na trombocyty (Obr. 46), následovalo několik kroků diferenciální centrifugace pro přečištění vzorku. Celý centrifugační protokol trval cca 60 minut a celkový objem výtěžku byl 500  $\mu$ l. Diskontinuální aferetický proces separace trombocytů byl proveden dle metodických pokynů Transfuzního oddělení FN Hradec Králové a trval cca 60–110 minut. Pro sjednocení podmínek izolace bylo také testováno promytí aferetického výtěžku ( $n = 17$ ) použitím stejných roztoků jako v případě izolace centrifugací.



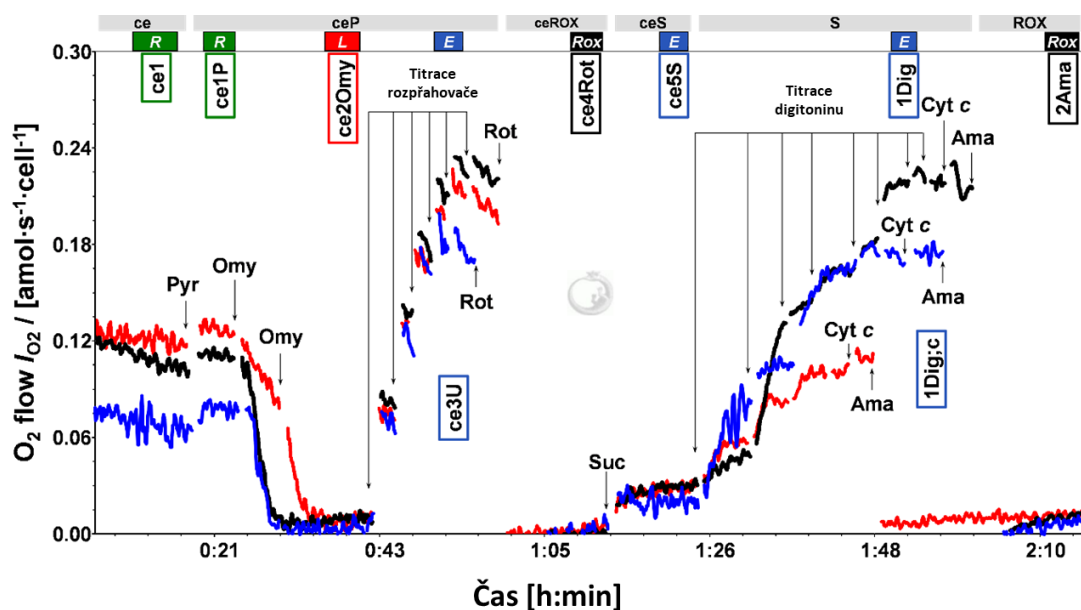
Obr. 46 Ukázka rozdělení vrstev krve po centrifugaci v hustotním gradientu

#### 4.5.2.2 Mitochondriální respirometrie

Pro zhodnocení mitochondriální respirace s HRR bylo využito oxygrafu (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko). Oxygraf byl vybaven dvěma polarografickými kyslíkovými senzory, které byly připevněné v izolovaných komůrkách o definovaném objemu 0,5 ml. Do každé komůrky bylo přidáno  $100\text{--}120 \times 10^6$

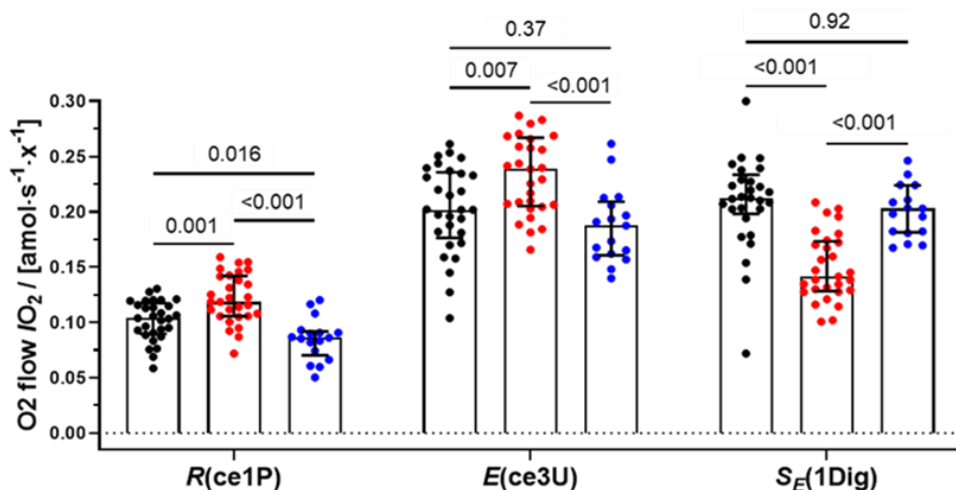
trombocytů v respiračním médiu MiR05 pro analýzu spotřeby kyslíku na elektrodě. Komplexní respirační médium MiR05 je složeno zejména z osmoticky aktivní látky sacharózy a albuminu o koncentraci 1 g/l pro stabilizaci mitochondriální membrány. Analýza probíhala dle stanoveného SUIT protokolu za stálého míchání při 37 °C po dobu 2–3 hodin. Data byla zaznamenávána v reálném čase pomocí softwaru DatLab 7.4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko). Pro popis mitochondriální respirace bylo využito několik respiračních stavů, které jsou uznávány jako základní kameny mitochondriální fyziologie [220]. V celé studii bylo použito názvosloví dle týmu prof. Gnaigera, zakladatele společnosti Oroboros Instruments (Innsbruck, Rakousko) [182]. Všechny respirační stavy jsou popsány podrobněji v teoretické části této práce v kapitole 3.5.3.1.

Celá analýza začala provedením kyslíkové kalibrace oxygrafu a poté bylo přidáno předem stanovené množství biologického vzorku. Po stabilizaci rutinní respirace (ROUTINE, R, ce1) byl přidán pyruvát (ce1P). Následoval přídavek oligomycinu, který sloužil k vyhodnocení LEAK stavu. Dále byl podnícen stav ETS titrováním optimální koncentrace rozpřahovače karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenylhydrazonu (FCCP, ce3U). Po dosažení maximální kapacity ETS byl přidán inhibitor komplexu I rotenon (ce4Rot), který zabrání oxidaci NADH, čímž získáme ROX. Následně byl přidán sukcinát jako substrát komplexu II (ce5S) a poté pro vyhodnocení kvality izolace a integrity plazmatické membrány jsme využili hodnocení indexu viability dle Doerrier et al. [183]. Plazmatická membrána všech buněk byla následně permeabilizována titrací digitoninem (1Dig). Cytochrom c (1Dig; c) byl dodán pro vyloučení poruchy integrity OMM. Nakonec byl přidán inhibitor komplexu III antimycin A (2Ama), který zastavil tok elektronů na cytochrom c a současně i mitochondriální spotřebu kyslíku (Rox). Reprezentativní měření jednotlivých výtěžků izolace trombocytů jsou zobrazena na Obr. 47.



Obr. 47 Reprezentativní měření respiračního protokolu u výtěžku trombocytů z centrifugační izolace (černá), aferézy (červená) a promytého aferetického vzorku (modrá). Osa X – čas analýzy a osa Y – spotřeba kyslíku závislá na počtu buněk v komůrce. Pyr – pyruvát; Omy – oligomycin; Rot – rotenon; Suc – sukcinát; Cyt c – cytochrom c; Ama – antimycin A; R – ROUTINE; L – LEAK; E – ETS; Rox – ROX

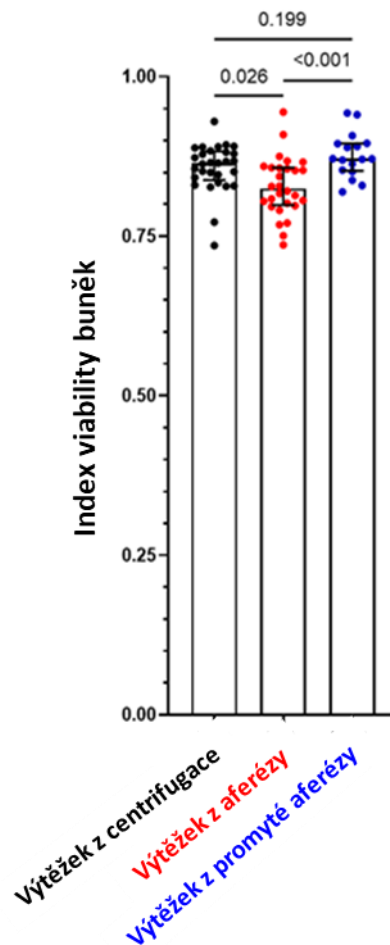
Při vyhodnocení výsledků nebyly pozorovány změny v LEAK respiraci u všech výtěžků. Naopak u ROUTINE respirace byl pozorován nárůst o 22 % a také o 16 % v ETS kapacitě u aferetických výtěžků ve srovnání s výtěžky získanými centrifugací ( $p = 0,001$ ; Obr. 48). Sukcinátová oxidace byla naopak nižší o 57 % u aferetických výtěžků ( $p < 0,001$ ; Obr. 48). Výsledky byly také podpořeny nutností aplikace vyšších koncentrací oligomycinu (2,2 $\times$ ), rozpřahovače karbonylkyanid-p-trifluormethoxyfenyl hydrazonu (3,5 $\times$ ) a digitoninu (2,5 $\times$ ) u aferetických výtěžků k navození optimálního stavu odezvy při analýze. Tato fakta naznačovala, že složky plazmy dárce mohou být přeneseny z aferetického výtěžku do respiračního média, což mohlo podpořit ROUTINE respiraci trombocytů, a naopak tlumit účinky oligomycinu, rozpřahovače a digitoninu. Aby tato hypotéza byla ověřena, výtěžky z aferézy byly promyty stejnými roztoky použitými pro izolaci pomocí centrifugace. Roztoky pro promytí obsahovaly ethylen glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctovou kyselinu, která chelatuje vápenaté ionty z plazmy. Po analýze promytých aferetických vzorků byly rozdíly v respiraci téměř odstraněny (Obr. 48).



Obr. 48 Vliv izolačních metod na mitochondriální respiraci trombocytů. Výtěžky trombocytů z centrifugační izolace (černá), aferézy (červená) a promytého aferetického vzorku (modrá). Osa X – čas analýzy a osa Y – spotřebu kyslíku závislá na počtu buněk v komůrce; porovnání stavů ROUTINE respirace (Rce1P), ETS kapacity (Ece3U) a sukcinátové ETS kapacity permeabilizovaných buněk (S<sub>E</sub>, 1Dig). Hodnoty *p* jsou uvedeny nad příslušným párovým porovnáním a byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu dvojného třídění (two-way ANOVA).

Kvalita trombocytů byla hodnocena pomocí indexu viability buněk (Obr. 49). Index viability byl mírně avšak statisticky významně vyšší u výtěžků získaných centrifugací 87 % oproti 83 % u aferetických výtěžků ( $p = 0,026$ ). Test viability byl vyhodnocen na základě skutečnosti, že plazmatická membrána trombocytů je nepropustná pro externě dodaný sukcinát, který stimuluje dýchání pouze u buněk živých s funkčními mitochondriemi. V případě buněk, které mají permeabilizovanou membránu (např. mechanicky při přípravě vzorku), ale mají funkční mitochondrie, dochází k zahájení respirace stimulované sukcinátem. Tímto jevem je možné vypočítat procento destiček, které byly poškozeny při izolaci, jelikož u těchto buněk je ROUTINE respirace zanedbatelná (mitochondrie spoléhají pouze na substráty v buňce). Pokud je ale membrána poškozena a buňky nemají funkční mitochondrie nedochází ke stimulaci dýchání sukcinátem, protože buňky jsou považovány za mrtvé. Díky titraci digitoninu dochází k permeabilizaci plazmatické membrány (1Dig) a dosažení maximální sukcinátové ETS kapacity udává referenční stav 100 % permeabilizovaných buněk v celé mitochondriální populaci [183]. Z výsledku je

patrné, že dochází k obnově viability po promytí aferetických výtěžků trombocytů (Obr. 49).



Obr. 49 Vliv izolačních metod a médií na viabilitu trombocytů. Výtěžky trombocytů z centrifugační izolace (černá), aferézy (červená) a promytého aferetického vzorku (modrá). Respirimetrický index viability buněk byl vypočten dle rovnice:  $V/R = 1 - (J_{ce5S} - J_{ce4Rot}) / (J_{1Dig} - J_{2Ama})$  [183]. Hodnoty  $p$  jsou uvedeny nad příslušným párovým porovnáním a byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu jednoduchého třídění (one-way ANOVA, model se smíšenými efekty).

#### 4.5.2.3 Vyšetření aktivace trombocytů

CD62P (P-selektin) a CD63 byly použity jako markery pro aktivaci a degranulaci trombocytů. Všechny výtěžky izolace včetně kontrolní krve odebrané do zkumavek s K<sub>2</sub>EDTA a citrátem sodným byly vyšetřeny v laboratoři Oddělení klinické imunologie a alergologie FN Hradec Králové. K analýze byl využit průtokový cytometr Navios 10 (Beckman Coulter, Praha, Česká republika). Vzorky krve citrátu a K<sub>2</sub>EDTA byly použity

jako kontrola pro porovnání aktivace trombocytů. CD62P (P-selektin) je antigen, který reflektuje stupeň aktivace trombocytů, zatímco exprese markeru CD63 slouží k detekci aktivovaných bazofilů a dobře koreluje s jejich degranulací. Výsledky ukázaly, že trombocyty nebyly aktivovány v průběhu izolace centrifugací a aferetickou separací v porovnání s jejich příslušnou kontrolní krví v K<sub>2</sub>EDTA a citrátu.

### **4.5.3 Shrnutí**

V této metodologické studii byla prokázána aplikovatelnost HRR pro popis a studium metabolického profilu trombocytů. Bylo také ověřeno použití dárcovské aferézy jako vhodné klinické metody pro izolaci trombocytů, která zachovává mitochondriální integritu a funkci trombocytů srovnatelně s laboratorní technikou izolace pomocí centrifugace. Všechny pozorované rozdíly v respiraci výtěžků trombocytů mezi oběma metodami izolace byly odstraněny po promytí aferetického vzorku. Lze tedy usuzovat, že všechny rozdíly byly způsobené látkami přenesenými z plazmy do respiračního média u skupiny výtěžků z aferézy. Tyto výsledky naznačují, že výběr média pro skladování a následné měření mitochondriální respirace může být klíčovým faktorem při použití trombocytů jako biomarkerů mitochondriálních změn u patologických stavů v lidském organismu. Při testování aktivace trombocytů nebyl pozorován žádný významný účinek způsobený různými izolačními postupy.

Výsledky studie, kde byl získán datový soubor fyziologického mitochondriálního fenotypu, potvrzují aplikovatelnost funkční mitochondriální analýzy trombocytů v biomedicínském výzkumu u pacientů s trombocytopenií, sepsí a metabolickými chorobami.

## 5. ZÁVĚR

Disertační práce shrnuje moji vědeckou činnost ve Výzkumné laboratoři Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové během mého doktorského studia na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

První rozsáhlejší část je věnována vývoji a využití HPLC metod se zaměřením na aplikace v onkologii a parodontologii. Byla vyvinuta nová HPLC-DAD-FLD metoda pro stanovení neopterinu, tryptofanu, kynureninu, kreatininu a kyseliny močové ve slinách a UHPLC-FLD-MS/MS metoda pro stanovení neopterinu, tryptofanu, kynureninu a kreatininu v gingivální tekutině. Největším úskalím vývoje nových metod bylo vyvinout metodiku vhodného odběru a úpravy vzorku, aby byl méně invazivní pro pacienta a zároveň splňoval podmínky pro kvantifikaci cílových látek. Vyvinutá a v práci zmíněná metoda pro stanovení zánětlivých biomarkerů v gingivální tekutině dosáhla vyšší citlivosti než běžně využívané imunologické metody. Obě zmíněné metody splňovaly validační kritéria dle bioanalytických norem ICH a EMA a mohou být začleněny do portfolia Výzkumné laboratoře Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové.

Druhá část práce byla zaměřena na vyšetření funkce trombocytů pomocí senzoru Clarkova typu. Díky moderní respirometrii s vysokou senzitivitou byl analyzován metabolický profil a funkce trombocytů izolovaných z malého množství žilní krve. Byly zde porovnávány dva izolační přístupy pro přípravu vzorků, tj. čistě výzkumná metoda centrifugace v hustotním gradientu spojená s diferenciální centrifugací a klinická aferetická metoda. Vyhodnocení naměřených dat proběhlo na úrovni mitochondriální respirace, ale také relevance ve vztahu k aktivačním imunologickým parametrům trombocytů. Výsledkem bylo získání kontrolního souboru dat mitochondriální respirace trombocytů od zdravých dárců, který lze využít pro studium nejen hematologických onemocnění.

Výsledkem celé této práce je soubor nově vyvinutých chromatografických metod a metodického přístupu k vyšetření trombocytů, které mají potenciál být využity v diagnostice mnoha chorob a vedly k navázání spolupráce mezi různými klinickými pracovišti FN Hradec Králové a s Onkologickou klinikou FN Olomouc v rámci interních

projektů. Všechny výsledky, které vznikly během mého studia byly vydány v časopisech s IF.



## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 2006. ISBN 978-80-7262-324-2.
- [2] ZIMA, Tomáš a UNIVERZITA KARLOVA. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén : Karolinum, 2007. ISBN 978-80-7262-372-3.
- [3] KURUC, Matthew, Haiyan ZHENG, Amenah SOHERWARDY, Sowmya AVADHANI, Devjit ROY, Ingrid VERHAMME a Swapan ROY. New Strategies to Categorize Blood for Proteomic Biomarker Discovery. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*. 2020, **2**, 90–107.
- [4] LAI, Anne Y. a Motonari KONDO. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Seminars in Immunology* [online]. 2008, **20**(4), 207–212 [vid. 2021-10-30]. ISSN 10445323. Dostupné z: doi:10.1016/j.smim.2008.05.002
- [5] PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu. [2. díl]*. Český Těšín: FINIDR, 2006. ISBN 978-80-86682-00-6.
- [6] ZAPATA, Juan C., Dermot COX a Maria S. SALVATO. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [online]. 2014, **8**(6), e2858 [vid. 2021-10-30]. ISSN 1935-2735. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pntd.0002858
- [7] DAVÌ, Giovanni a Carlo PATRONO. Platelet Activation and Atherothrombosis. *New England Journal of Medicine* [online]. 2007, **357**(24), 2482–2494 [vid. 2022-03-06]. ISSN 0028-4793, 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra071014
- [8] JABOR, Antonín. *Vnitřní prostředí*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1221-5.
- [9] *Odběrový systém na moč - Monovette*. [online]. B.m.: Asker. Dostupné z: <https://www.asker.cz/zkumavky-pro-odber/urine-monovette-pro-odber-moci/>
- [10] LIU, Jingyi a Yixiang DUAN. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology* [online]. 2012, **48**(7), 569–577 [vid. 2019-06-11]. ISSN 13688375. Dostupné z: doi:10.1016/j.oraloncology.2012.01.021
- [11] KAMODYOVÁ, Natália, Lenka BAŇASOVÁ, Katarína JANŠÁKOVÁ, Ivana KOBOROVÁ, Ľubomíra TÓTHOVÁ, Peter STANKO a Peter CELEC. Blood Contamination in Saliva: Impact on the Measurement of Salivary Oxidative Stress Markers. *Disease Markers* [online]. 2015, **2015**, 1–10 [vid. 2020-11-08]. ISSN 0278-0240, 1875-8630. Dostupné z: doi:10.1155/2015/479251
- [12] NGAMCHUEA, Kamonwad, Korbua CHAISIWAMONGKHOL, Christopher BATCHELOR-MCAULEY a Richard G. COMPTON. Chemical analysis in saliva

- and the search for salivary biomarkers – a tutorial review. *The Analyst* [online]. 2018, **143**(1), 81–99 [vid. 2019-06-10]. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/C7AN01571B
- [13] *Collection Methods: Passive Drool using the Saliva Collection Aid* [online]. B.m.: Salimetrics. leden 2021. Dostupné z: <https://salimetrics.com/wp-content/uploads/2018/02/passive-drool-saliva-collection-instructions.pdf>
- [14] BELLAGAMBI, Francesca G., Tommaso LOMONACO, Pietro SALVO, Federico VIVALDI, Marie HANGOUËT, Silvia GHIMENTI, Denise BIAGINI, Fabio DI FRANCESCO, Roger FUOCO a Abdelhamid ERRACHID. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **124**, 115781 [vid. 2021-11-22]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.115781
- [15] GREABU, Maria, Maurizio BATTINO a Maria MOHORA. Saliva-a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *Journal of Medicine and Life*. 2009, (2(2)), 124–132. ISSN 1844-122X.
- [16] NEWMAN, Michael G. *Newman and carranza's clinical periodontology*. 13th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, Inc, 2018. ISBN 978-0-323-52300-4.
- [17] GRIFFITHS, Gareth S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid: Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000* [online]. 2003, **31**(1), 32–42 [vid. 2021-03-23]. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0757.2003.03103.x
- [18] KHURSHID, Zohaib, Ibrahim WARSI, Syed F. MOIN, Paul D. SLOWEY, Muhammad LATIF, Sana ZOHAIB a Muhammad S. ZAFAR. Biochemical analysis of oral fluids for disease detection. In: *Advances in Clinical Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 2021 [vid. 2021-07-16], 205–253. ISBN 978-0-12-823922-3. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acc.2020.04.005
- [19] LAMSTER, I. B a J. K AHLO. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2007, **1098**(1), 216–229 [vid. 2021-03-23]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1384.027
- [20] BRILL, Niels a B O KRASSE. The Passage of Tissue Fluid into the Clinically Healthy Gingival Pocket. *Acta Odontologica Scandinavica* [online]. 1958, **16**(3), 233–245 [vid. 2021-07-16]. ISSN 0001-6357, 1502-3850. Dostupné z: doi:10.3109/00016355809064110
- [21] GUPTA, G. Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator- II: Inflammatory mediators, host-response modifiers and chair side diagnostic aids. *Journal of Medicine and Life*. 2013, **6**(1), 7–13. ISSN 1844-3117.
- [22] BODUR, Aysen, Terken BAYDAR, Nurdan OZMERIC, Ayse Basak ENGIN, Ahu URAZ, Kaya EREN a Gonul SAHIN. Neopterin Profile to Evaluate the

- Effectiveness of Treatment in Aggressive Periodontitis. *Pteridines* [online]. 2003, **14**(3), 77–81 [vid. 2021-07-16]. ISSN 2195-4720, 0933-4807. Dostupné z: doi:10.1515/pteridines.2003.14.3.77
- [23] SLEZÁK, Radovan. *Preklinická parodontologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2007. ISBN 978-80-87009-18-5.
- [24] WERNER-FELMAYER, Gabriele, Ernst Robert WERNER, Dietmar FUCHS, Arno HAUSEN, Gilbert REIBNEGGER a Helmut WACHTER. Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  and Lipopolysaccharide Enhance Interferon-Induced Tryptophan Degradation and Pteridine Synthesis in Human Cells. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* [online]. 1989, **370**(2), 1063–1070 [vid. 2021-10-04]. ISSN 0177-3593. Dostupné z: doi:10.1515/bchm3.1989.370.2.1063
- [25] KHURSHID, Zohaib, Maria MALI, Mustafa NASEEM, Shariq NAJEEB a Muhammad ZAFAR. Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. *Dentistry Journal* [online]. 2017, **5**(1), 12 [vid. 2021-08-03]. ISSN 2304-6767. Dostupné z: doi:10.3390/dj5010012
- [26] SUBBARAO, KrishnanChandragiri, GowriShankar NATTUTHURAI, SatheeshKhannaa SUNDARARAJAN, Indhu SUJITH, Jennifer JOSEPH a YasminParvin SYEDSHAH. Gingival crevicular fluid: An overview. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* [online]. 2019, **11**(6), 135 [vid. 2021-06-23]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/JPBS.JPBS\_56\_19
- [27] WASSALL, Rebecca R. a Philip M. PRESHAW. Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontology 2000* [online]. 2016, **70**(1), 65–79 [vid. 2021-08-03]. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1111/prd.12109
- [28] KATOH, Setsuko, Terumi SUEOKA, Sadao MATSUURA a Takashi SUGIMOTO. Biopterin and neopterin in human saliva. *Life Sciences* [online]. 1989, **45**(26), 2561–2568 [vid. 2022-08-10]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/0024-3205(89)90240-3
- [29] KRCMOVA, Lenka Kujovska, Barbora CERVINKOVA, Dagmar SOLICHOVA, Lubos SOBOTKA, Lenka HANSMANOVA, Bohuslav MELICHAR a Petr SOLICH. Fast and sensitive HPLC method for the determination of neopterin, kynurenine and tryptophan in amniotic fluid, malignant effusions and wound exudates. *Bioanalysis* [online]. 2015, **7**(21), 2751–2762 [vid. 2019-07-18]. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.15.175
- [30] MILLNER, M. M., W. FRANTHAL, G. H. THALHAMMER, A. BERGHOLD, R. M. AIGNER, G. F. FÜGER a G. REIBNEGGER. Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum as an aid in differentiating central nervous system and peripheral infections in children. *Clinical Chemistry*. 1998, **44**(1), 161–167. ISSN 0009-9147.

- [31] ZEIMET, A G, M WIDSCHWENDTER, C KNABBE, D FUCHS, M HEROLD, E MÜLLER-HOLZNER, G DAXENBICHLER, F A OFFNER, O DAPUNT a C MARTH. Ascitic interleukin-12 is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 1998, **16**(5), 1861–1868 [vid.2022-08-10]. ISSN 0732-183X, 1527-7755. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.1998.16.5.1861
- [32] BERDOWSKA, A. a K. ZWIRSKA-KORCZALA. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* [online]. 2001, **26**(5), 319–329 [vid.2022-08-10]. ISSN 0269-4727, 1365-2710. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2710.2001.00358.x
- [33] HARA, Satoshi, Tama SANATANI, Natsuo TACHIKAWA, Yukihiro YOSHIMURA, Nobuyuki MIYATA, Hiroaki SASAKI, Risa KURODA, Chinatsu KAMIKOKURYO, Tomohiro EGUCHI, Shuhei NIIYAMA, Yasuyuki KAKIHANA a Hiroshi ICHINOSE. Comparison of the levels of neopterin, CRP, and IL-6 in patients infected with and without SARS-CoV-2. *Heliyon* [online]. 2022, **8**(5), e09371 [vid. 2022-08-10]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09371
- [34] POSPÍŠKOVÁ, Markéta, Ondřej STROUHAL, Eva HLÍDKOVÁ, Zuzana VLACHOVÁ, Bohuslav MELICHAR a Martin DOLEŽEL. Circulating concentrations of citrulline, neopterin, kynurenine, and tryptophan during chemoradiation in patients with cervical carcinoma. *Pteridines* [online]. 2021, **32**(1), 93–97 [vid. 2022-08-11]. ISSN 2195-4720. Dostupné z: doi:10.1515/pteridines-2020-0032
- [35] SCHRÖCKSNADDEL, Katharina, Barbara WIRLEITNER, Christiana WINKLER a Dietmar FUCHS. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2006, **364**(1–2), 82–90 [vid. 2019-06-24]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2005.06.013
- [36] CHEN, Yiquan a Gilles J. GUILLEMIN. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. *International Journal of Tryptophan Research* [online]. 2009, **2**, IJTR.S2097 [vid. 2021-10-04]. ISSN 1178-6469, 1178-6469. Dostupné z: doi:10.4137/IJTR.S2097
- [37] BUCZKO, Włodzimierz, Dorota CYLWIK a Wanda STOKOWSKA. [Metabolism of tryptophan via the kynurenine pathway in saliva]. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej (Online)*. 2005, **59**, 283–289. ISSN 1732-2693.
- [38] MOUTEREAU, Stéphane, Najia ECH CHAD, Michel DEVANLAY, Liliane ESMILAIRE a Sylvain LORIC. Improved neopterin ELISA kit: a good compromise between HPLC results and clinical practice. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2011, **49**(3) [vid. 2022-08-23]. ISSN 1437-4331, 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/CCLM.2011.071
- [39] HAUSEN, Arno, Dietmar FUCHS, Klaus KÖNIG a Helmut WACHTER. Determination of neopterin in human urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1982, **227**(1), 61–70 [vid. 2021-12-05]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(00)80356-4

- [40] KRCMOVA, Lenka, Dagmar SOLICHOVA, Bohuslav MELICHAR, Marketa KASPAROVA, Jiri PLISEK, Luboš SOBOTKA a Petr SOLICH. Determination of neopterin, kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum by high throughput HPLC. *Talanta* [online]. 2011, **85**(3), 1466–1471 [vid. 2019-06-24]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2011.06.027
- [41] HUANG, Yong, Alexander LOUIE, Qiyun YANG, Nicholas MASSENKOFF, Connie XU, Peter W HUNT a Winnie GEE. A simple LC–MS/MS method for determination of kynurenine and tryptophan concentrations in human plasma from HIV-infected patients. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(11), 1397–1407 [vid. 2021-12-04]. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio.13.74
- [42] NOVÁKOVÁ, Lucie, Lucie HAVLÍKOVÁ a Hana VLČKOVÁ. Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, **63**, 55–64 [vid. 2021-11-22]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.08.004
- [43] MAHENDRA, Jaideep, SaiKrishna BORRA, Aishwarya NAGARAJAN a Little MAHENDRA. Estimation of salivary neopterin in chronic periodontitis. *Indian Journal of Dental Research* [online]. 2014, **25**(6), 794 [vid. 2019-06-24]. ISSN 0970-9290. Dostupné z: doi:10.4103/0970-9290.152207
- [44] ÜNÜVAR, Songül, Duygu ERGE, Bilge KILIÇARSLAN, Harika Gözde GÖZÜKARA BAĞ, Ferhat ÇATAL, Gözde GIRGIN a Terken BAYDAR. Neopterin levels and Indoleamine 2,3-dioxygenase activity as biomarkers of immune system activation and childhood allergic diseases. *Annals of Laboratory Medicine* [online]. 2019, **39**(3), 284 [vid. 2019-07-19]. ISSN 2234-3806, 2234-3814. Dostupné z: doi:10.3343/alm.2019.39.3.284
- [45] BAXTER-PARKER, Gregory, Anna CHU, Peter PETOCZ, Samir SAMMAN a Steven P. GIESEG. Simultaneous analysis of neopterin, kynurenine and tryptophan by amine-HPLC shows minor oxidative stress from short-term exhaustion exercise. *Pteridines* [online]. 2019, **30**(1), 21–32 [vid. 2019-07-19]. ISSN 2195-4720, 0933-4807. Dostupné z: doi:10.1515/pteridines-2019-0003
- [46] BUCZKO, Piotr, Anna TANKIEWICZ-KWEDLO, Agnieszka BURACZEWSKA, Michal MYCELIWIEC a Dariusz PAWLAK. Accumulation of kynurenine pathway metabolites in saliva and plasma of uremic patients. *Pharmacological Reports*. 2007, **59**(1), 199–204. ISSN 1734-1140.
- [47] FUERTIG, René, Angelo CECI, Sandrine M CAMUS, Erwan BEZARD, Andreas H LUIPPOLD a Bastian HENGERER. LC–MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain. *Bioanalysis* [online]. 2016, **8**(18), 1903–1917 [vid. 2021-12-04]. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2016-0111
- [48] DE JONG, Wilhelmina H.A., Reinier SMIT, Stephan J.L. BAKKER, Elisabeth G.E. DE VRIES a Ido P. KEMA. Plasma tryptophan, kynurenine

- and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, **877**(7), 603–609 [vid. 2021-12-04]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.015
- [49] INOUE, K, T NAMIKI, Y IWASAKI, Y YOSHIMURA a H NAKAZAWA. Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, **785**(1), 57–63 [vid. 2019-06-11]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(02)00850-4
- [50] DE CASTRO, Marcel Ribeiro, Giovana Seno DI MARCO, Danielle Yuri ARITA, Luciana Cristina TEIXEIRA, Aparecido Bernardo PEREIRA a Dulce Elena CASARINI. Urinary neopterin quantification by reverse-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2004, **59**(3), 275–283 [vid. 2021-12-04]. ISSN 0165022X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbbm.2004.03.004
- [51] RULE, Andrew D., Timothy S. LARSON, Erik J. BERGSTRALH, Jeff M. SLEZAK, Steven J. JACOBSEN a Fernando G. COSIO. Using Serum Creatinine To Estimate Glomerular Filtration Rate: Accuracy in Good Health and in Chronic Kidney Disease. *Annals of Internal Medicine* [online]. 2004, **141**(12), 929 [vid. 2022-05-23]. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/0003-4819-141-12-200412210-00009
- [52] KAMPMANN, Jp a Jm HANSEN. Glomerular filtration rate and creatinine clearance. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 1981, **12**(1), 7–14 [vid. 2022-05-23]. ISSN 03065251. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2125.1981.tb01848.x
- [53] GREENHAFF, Paul L. The nutritional biochemistry of creatine. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 1997, **8**(11), 610–618 [vid. 2021-11-26]. ISSN 09552863. Dostupné z: doi:10.1016/S0955-2863(97)00116-2
- [54] OU, Meixian, Yunxiao SONG, Shuijun LI, Gangyi LIU, Jingying JIA, Menqi ZHANG, Haichen ZHANG a Chen YU. LC-MS/MS Method for Serum Creatinine: Comparison with Enzymatic Method and Jaffe Method. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(7), e0133912 [vid. 2021-11-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0133912
- [55] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ, Jaroslav CERMAN, a UNIVERZITA KARLOVA. *Biochemie pro studující medicíny*. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1414-4.
- [56] MOORE, Suzanne, Karen A.C. CALDER, Nicholas J. MILLER a Catherine A. RICE-EVANS. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radical Research* [online]. 1994, **21**(6), 417–425 [vid. 2019-06-10]. ISSN 1071-5762, 1029-2470. Dostupné z: doi:10.3109/10715769409056594



- [57] SHETTY, Mamatha S., Amitha RAMESH, Prasanna Kumar SHETTY a Priyanka AGUMBE. Salivary and serum antioxidants in women with preeclampsia with or without periodontal disease. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India* [online]. 2018, **68**(1), 33–38 [vid. 2019-06-10]. ISSN 0971-9202, 0975-6434. Dostupné z: doi:10.1007/s13224-017-0993-4
- [58] ZHAO, Jianxing a Ying HUANG. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker for monitoring the efficacy of urate-lowering therapy in a patient with chronic gouty arthropathy. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, **450**, 115–120 [vid. 2019-06-24]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2015.08.005
- [59] GOLL, Robert D. a Basab K. MOOKERJEE. Correlation of Biochemical Parameters in Serum and Saliva in Chronic Azotemic Patients and Patients on Chronic Hemodialysis. *Journal of Dialysis* [online]. 1978, **2**(4), 399–414 [vid. 2020-04-06]. ISSN 0362-8558. Dostupné z: doi:10.3109/08860227809079326
- [60] OWEN-SMITH, Brian, Jeremy QUINEY a James READ. Salivary urate in gout, exercise, and diurnal variation. *The Lancet* [online]. 1998, **351**(9120), 1932 [vid. 2019-06-10]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(05)78616-5
- [61] SHIBASAKI, Koichi, Masatoshi KIMURA, Ryuichi IKARASHI, Akira YAMAGUCHI a Takuya WATANABE. Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia. *Metabolomics* [online]. 2012, **8**(3), 484–491 [vid. 2019-06-10]. ISSN 1573-3882, 1573-3890. Dostupné z: doi:10.1007/s11306-011-0334-z
- [62] RIIS, Jenna L, Crystal I BRYCE, Marla J MATIN, John L STEBBINS, Olga KORNIENKO, Lauren van HUISSTEDE a Douglas A GRANGER. The validity, stability, and utility of measuring uric acid in saliva. *Biomarkers in Medicine* [online]. 2018, **12**(6), 583–596 [vid. 2020-03-22]. ISSN 1752-0363, 1752-0371. Dostupné z: doi:10.2217/bmm-2017-0336
- [63] BILANCIO, Giancarlo, Pierpaolo CAVALLO, Cinzia LOMBARDI, Ermanno GUARINO, Vincenzo COZZA, Francesco GIORDANO, Giuseppe PALLADINO a Massimo CIRILLO. Saliva for assessing creatinine, uric acid, and potassium in nephropathic patients. *BMC Nephrology* [online]. 2019, **20**(1) [vid. 2020-03-22]. ISSN 1471-2369. Dostupné z: doi:10.1186/s12882-019-1437-4
- [64] PERELLO, J, P SANCHIS a F GRASES. Determination of uric acid in urine, saliva and calcium oxalate renal calculi by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2005, **824**(1–2), 175–180 [vid. 2019-06-10]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2005.07.024
- [65] HONEYCHURCH, Kevin C. The determination of uric acid in human saliva by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Analytical, Bioanalytical and Separation Techniques* [online]. 2017, **2**(1), 47–51 [vid. 2019-06-10]. ISSN 24761869. Dostupné z: doi:10.15436/2476-1869.17.1280

- [66] LIU, Xin-Ying, Ying LUO, Chun-Yu ZHOU, Ai PENG a Jun-Yan LIU. A sensitive and accurate method to simultaneously measure uric acid and creatinine in human saliva by using LC–MS/MS. *Bioanalysis* [online]. 2017, **9**(22), 1751–1760 [vid. 2019-06-10]. ISSN 1757-6180, 1757-6199. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2017-0189
- [67] VAKH, Christina, Stanisława KORONKIEWICZ, Sławomir KALINOWSKI, Leonid MOSKVIN a Andrey BULATOV. An automatic chemiluminescence method based on the multi-pumping flow system coupled with the fluidized reactor and direct-injection detector: Determination of uric acid in saliva samples. *Talanta* [online]. 2017, **167**, 725–732 [vid. 2020-03-22]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.02.009
- [68] XING, Xiaoping, Xue SHI, Meijiang ZHANG, Wei JIN a Jiannong YE. CE determination of creatinine and uric acid in saliva and urine during exercise. *Chromatographia* [online]. 2008, **67**(11–12), 985–988 [vid. 2019-06-10]. ISSN 0009-5893, 1612-1112. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-008-0599-1
- [69] MORI, Masanobu, Tsukasa YAMAMOTO, Maki KASEDA, Sachiko YAMADA a Hideyuki ITABASHI. Capillary ion electrophoresis of inorganic anions and uric acid in human saliva using a polyvinyl alcohol coated capillary column and hexamethonium chloride as additive of background electrolyte. *Journal of Chromatography B* [online]. 2012, **887–888**, 1–7 [vid. 2019-06-10]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.12.027
- [70] CHU, Q. C., M. LIN, C. H. GENG a J. N. YE. Determination of uric acid in human saliva and urine using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. *Chromatographia* [online]. 2007, **65**(3–4), 179–184 [vid. 2019-06-10]. ISSN 0009-5893, 1612-1112. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-006-0142-1
- [71] GUAN, Yueqing, Qingcui CHU a Jiannong YE. Determination of uric acid in human saliva by capillary electrophoresis with electrochemical detection: potential application in fast diagnosis of gout. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2004, **380**(7–8), 913–917 [vid. 2019-06-10]. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-004-2848-y
- [72] GIEBUŁTOWICZ, Joanna, Piotr WROCZYŃSKI a Danuta SAMOLCZYK-WANYURA. Comparison of antioxidant enzymes activity and the concentration of uric acid in the saliva of patients with oral cavity cancer, odontogenic cysts and healthy subjects: salivary antioxidants in oral pathologies. *Journal of Oral Pathology & Medicine* [online]. 2011, **40**(9), 726–730 [vid. 2019-06-10]. ISSN 09042512. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01045.x
- [73] GÜMÜŞ, Pınar, Nurcan BUDUNELI, Şevki ÇETINKALP, Samuel I. HAWKINS, Diane RENAUD, Denis F. KINANE a David A. SCOTT. Salivary antioxidants in patients with type 1 or 2 diabetes and inflammatory periodontal disease: a case-control study. *Journal of Periodontology* [online]. 2009, **80**(9), 1440–1446 [vid. 2019-06-10]. ISSN 0022-3492, 1943-3670. Dostupné z: doi:10.1902/jop.2009.090159



- [74] BAKHTIARI, Sedigheh, Parviz TOOSI, Saeed SAMADI a Mahin BAKHSHI. Assessment of uric acid level in the saliva of patients with oral lichen planus. *Medical Principles and Practice* [online]. 2017, **26**(1), 57–60 [vid. 2019-06-10]. ISSN 1011-7571, 1423-0151. Dostupné z: doi:10.1159/000452133
- [75] MUSSAVIRA, Sayeeda, Mala DHARMALINGAM a Bindhu OMANA SUKUMARAN. Salivary glucose and antioxidant defense markers in type II diabetes mellitus. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES* [online]. 2015, **45**, 141–147 [vid. 2019-06-10]. ISSN 13000144, 13036165. Dostupné z: doi:10.3906/sag-1306-116
- [76] SOUKUP, Maria, Izabela BIESIADA, Aaron HENDERSON, Benmichael IDOWU, Derek RODEBACK, Lance RIDPATH, Edward G BRIDGES, Andrea M NAZAR a Kristie BRIDGES. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. *Diabetology & Metabolic Syndrome* [online]. 2012, **4**(1), 14 [vid. 2019-06-10]. ISSN 1758-5996. Dostupné z: doi:10.1186/1758-5996-4-14
- [77] AL-RAWI, Natheer H. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diabetes and Vascular Disease Research* [online]. 2011, **8**(1), 22–28 [vid. 2021-12-04]. ISSN 1479-1641, 1752-8984. Dostupné z: doi:10.1177/14791641110390243
- [78] FLANAGAN, Robert James, David PERRETT a Robin WHELPTON. *Electrochemical Detection in HPLC: Analysis of Drugs and Poisons*. London: Royal Society of Chemistry. 2007. ISBN 9781847550729
- [79] MALON, Radha S. P., Sahba SADIR, Malarvili BALAKRISHNAN a Emma P. CÓRCOLES. Saliva-based biosensors: noninvasive monitoring tool for clinical diagnostics. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**, 1–20 [vid. 2019-06-10]. ISSN 2314-6133, 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2014/962903
- [80] WANG, Qiangwei, Xu WEN a Jinming KONG. Recent Progress on Uric Acid Detection: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2019, 1–17 [vid. 2020-03-23]. ISSN 1040-8347, 1547-6510. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2019.1637711
- [81] SIEKEVITZ, Philip. Powerhouse of the Cell. *Scientific American* [online]. 1957, **197**(1), 131–144 [vid. 2021-10-31]. ISSN 0036-8733. Dostupné z: doi:10.1038/scientificamerican0757-131
- [82] HOPPEL, Florian, Elisa CALABRIA, Dominik H. PESTA, Wilhelm KANTNER-RUMPLMAIR, Erich GNAIGER a Martin BURTSCHER. Effects of ultramarathon running on mitochondrial function of platelets and oxidative stress parameters: A pilot study. *Frontiers in Physiology* [online]. 2021, **12**, 632664 [vid. 2021-04-12]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2021.632664
- [83] DELINE, Marshall L., Martin GRASHEI, Frits H.A. VAN HEIJSTER, Franz SCHILLING, Joshua STRAUB a Tobias FROMME. Adenylate kinase derived ATP shapes

- respiration and calcium storage of isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2021, **1862**(7), 148409 [vid. 2021-11-05]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2021.148409
- [84] SAURA-ESTELLER, José, Ismael SÁNCHEZ-VERA, Sonia NÚÑEZ-VÁZQUEZ, Ana M. COSIALS, Pau GAMA-PÉREZ, Gauri BHOSALE, Lorena MENDIVE-TAPIA, Rodolfo LAVILLA, Gabriel PONS, Pablo M. GARCIA-ROVES, Michael R. DUCHEN, Daniel IGLESIAS-SERRET a Joan GIL. Activation of the Integrated Stress Response and ER Stress Protect from Fluorizoline-Induced Apoptosis in HEK293T and U2OS Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(11), 6117 [vid. 2021-11-05]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22116117
- [85] WATT, K. I., D. C. HENSTRIDGE, M. ZIEMANN, C. B. SIM, M. K. MONTGOMERY, D. SAMOCHA-BONET, B. L. PARKER, G. T. DODD, S. T. BOND, T. M. SALMI, R. S. LEE, R. E. THOMSON, A. HAGG, J. R. DAVEY, H. QIAN, R. KOOPMAN, A. EL-OSTA, J. R. GREENFIELD, M. J. WATT, M. A. FEBBRAIO, B. G. DREW, A. G. COX, E. R. PORRELLO, K. F. HARVEY a P. GREGOREVIC. Yap regulates skeletal muscle fatty acid oxidation and adiposity in metabolic disease. *Nature Communications* [online]. 2021, **12**(1), 2887 [vid. 2021-11-06]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-23240-7
- [86] FURIHATA, Takaaki, Shingo TAKADA, Naoya KAKUTANI, Satoshi MAEKAWA, Masaya TSUDA, Junichi MATSUMOTO, Wataru MIZUSHIMA, Arata FUKUSHIMA, Takashi YOKOTA, Nobuyuki ENZAN, Shouji MATSUSHIMA, Haruka HANDA, Yoshizuki FUMOTO, Junko NIO-KOBAYASHI, Toshihiko IWANAGA, Shinya TANAKA, Hiroyuki TSUTSUI, Hisataka SABE a Shintaro KINUGAWA. Cardiac-specific loss of mitoNEET expression is linked with age-related heart failure. *Communications Biology* [online]. 2021, **4**(1), 138 [vid. 2021-11-06]. ISSN 2399-3642. Dostupné z: doi:10.1038/s42003-021-01675-4
- [87] CHOWDHURY, Subir Roy, Cheryl PELTIER, Sen HOU, Amandeep SINGH, James B. JOHNSTON, Spencer B. GIBSON, Aaron J. MARSHALL a Versha BANERJI. Ex Vivo Mitochondrial Respiration Parallels Biochemical Response to Ibrutinib in CLL Cells. *Cancers* [online]. 2021, **13**(2), 354 [vid. 2021-11-06]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13020354
- [88] SCHEFFLER, Immo E. *Mitochondria* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007 [vid. 2021-11-06]. ISBN 978-0-470-19177-4. Dostupné z: doi:10.1002/9780470191774
- [89] RAFELSKI, Susanne M. Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC Biology* [online]. 2013, **11**(1), 71 [vid. 2021-11-06]. ISSN 1741-7007. Dostupné z: doi:10.1186/1741-7007-11-71
- [90] MILANE, Lara, Malav TRIVEDI, Amit SINGH, Meghna TALEKAR a Mansoor AMIJI. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **207**, 40–58 [vid. 2021-11-06]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.03.036

- [91] MANFREDI, Giovanni a Hibiki KAWAMATA. Mitochondria and endoplasmic reticulum crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* [online]. 2016, **90**, 35–42 [vid. 2021-11-06]. ISSN 09699961. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2015.08.004
- [92] WOHLRAB, Hartmut. Transport proteins (carriers) of mitochondria. *IUBMB Life* [online]. 2009, **61**(1), 40–46 [vid. 2021-11-06]. ISSN 15216543, 15216551. Dostupné z: doi:10.1002/iub.139
- [93] NICHOLLS, David G a Stuart J FERGUSON. *Bioenergetics 3* [online]. Burlington: Elsevier Science, 2002 [vid. 2021-11-07]. ISBN 978-0-08-052793-2. Dostupné z: <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=317041>
- [94] DIMAURO, Salvatore a Eric A. SCHON. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *American Journal of Medical Genetics* [online]. 2001, **106**(1), 18–26 [vid. 2022-05-09]. ISSN 0148-7299, 1096-8628. Dostupné z: doi:10.1002/ajmg.1392
- [95] LARSSON, Nils-Göran a Rolf LUFT. Revolution in mitochondrial medicine. *FEBS Letters* [online]. 1999, **455**(3), 199–202 [vid. 2022-05-09]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(99)00854-6
- [96] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUSA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]; [Klatovy]: Lucie Nováková ; Michal Dousa, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [97] NOVÁKOVÁ, Lucie a Hana VLČKOVÁ. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **656**(1–2), 8–35 [vid. 2021-11-18]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.10.004
- [98] NOVÁKOVÁ, Lucie. *Advances in Sample Preparation for Biological Fluids* [online]. B.m.: LCGC. 1. říjen 2016. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/advances-sample-preparation-biological-fluids>
- [99] LI, Wenkui, Jie ZHANG a Francis L. S. TSE, ed. *Handbook of LC-MS bioanalysis: best practices, experimental protocols, and regulations*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-1-118-67135-1.
- [100] OCAÑA-GONZÁLEZ, Juan Antonio, Rut FERNÁNDEZ-TORRES, Miguel Ángel BELLO-LÓPEZ a María RAMOS-PAYÁN. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, **905**, 8–23 [vid. 2021-11-18]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.10.041
- [101] STAHNKE, Helen, Stefan KITTLAUS, Günther KEMPE a Lutz ALDER. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass

- Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? *Analytical Chemistry* [online]. 2012, **84**(3), 1474–1482 [vid. 2021-11-18]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac202661j
- [102] ROPER, Peter, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (GREAT BRITAIN) a LABORATORY OF THE GOVERNMENT CHEMIST (GREAT BRITAIN), ed. *Applications of reference materials in analytical chemistry*. Cambridge: published for Laboratory of the Government Chemist by the Royal Society of Chemistry, 2001. ISBN 978-0-85404-448-1.
- [103] LI, Wenkui, Wenying JIAN a Yunlin FU, ed. *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2019 [vid. 2021-11-18]. ISBN 978-1-119-27429-2. Dostupné z: doi:10.1002/9781119274315
- [104] LEOS, J. Zeman a Andrew L. ZYDNEY. *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications* [online]. 1. vyd. B.m.: Routledge, 2017 [vid. 2021-11-20]. ISBN 978-0-203-74722-3. Dostupné z: doi:10.1201/9780203747223
- [105] *Microcon® Centrifugal Filter Devices-User guide* [online]. B.m.: Merck Millipore Ltd. Dostupné z: file:///C:/Users/ASUS/Documents/pr04305-rev0618.pdf
- [106] *Filters and Filtration Handbook* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2021-11-20]. ISBN 978-0-08-099396-6. Dostupné z: doi:10.1016/C2012-0-03230-9
- [107] WILSON, Keith, John M. WALKER, Andreas HOFMANN a Samuel CLOKIE, ed. *Wilson and Walker's principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Eighth edition. Cambridge, United Kingdom ; New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2018. ISBN 978-1-107-16227-3.
- [108] MIKKELSEN, Susan R. a Eduardo CORTÓN. *Bioanalytical Chemistry* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004 [vid. 2021-11-18]. ISBN 978-0-471-54447-0. Dostupné z: doi:10.1002/0471623628
- [109] RICKWOOD, D., T. C. FORD a Jens STEENSGAARD. *Centrifugation: essential data*. Chichester, West Sussex ; New York: Wiley, 1994. Essential data series. ISBN 978-0-471-94271-9.
- [110] PIRAMOON, Sheila. *Centrifuge Rotor Material Evolution: Advances in Rotor Design Using Composite Materials* [online]. 26. květen 2010. Dostupné z: <https://americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/1046-Centrifuge-Rotor-Material-Evolution-Advances-in-Rotor-Design-Using-Composite-Materials/>
- [111] FREI, Mark. *Centrifugation Separations* [online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-pulldown/centrifugation-separations>

- [112] GALLAGHER, Sean R. Centrifugation. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [online]. 2008, **00**(1) [vid. 2022-08-24]. ISSN 1948-3430, 1948-3430. Dostupné z: doi:10.1002/9780470089941.et0501s00
- [113] BYLDA, Caroline, Roland THIELE, Uwe KOBOLD a Dietrich A. VOLMER. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst* [online]. 2014, **139**(10), 2265 [vid. 2021-11-21]. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/c4an00094c
- [114] KOLE, Prashant Laxman, Gantala VENKATESH, Jignesh KOTTECHA a Ravi SHESHALA. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical Chromatography* [online]. 2011, **25**(1–2), 199–217 [vid. 2021-11-21]. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1560
- [115] LI, Wenkui, Jie ZHANG a Francis L. S. TSE, ed. *Handbook of LC-MS bioanalysis: best practices, experimental protocols, and regulations*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-1-118-67135-1.
- [116] KATAOKA, Hiroyuki, Keita SAITO a Atsushi YOKOYAMA. Sampling and Sample Preparation for Clinical and Pharmaceutical Analysis. In: Janusz PAWLISZYN a Heather L. LORD, ed. *Handbook of Sample Preparation* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011 [vid. 2021-11-21], 285–311. ISBN 978-0-8138-2362-1. Dostupné z: doi:10.1002/9780813823621.ch16
- [117] ETTRE, L. S. a K. I. SAKODYNSKII. M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903). *Chromatographia* [online]. 1993, **35**(3–4), 223–231 [vid. 2022-08-13]. ISSN 0009-5893, 1612-1112. Dostupné z: doi:10.1007/BF02269707
- [118] CZAPLICKI, Sylwester. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. In: Dean MARTIN, ed. *Column Chromatography* [online]. B.m.: InTech, 2013 [vid. 2021-11-21]. ISBN 978-953-51-1074-3. Dostupné z: doi:10.5772/55620
- [119] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J: Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [120] LINDSAY, Sandie. *High performance liquid chromatography*. 2nd ed. Chichester, England ; New York: Published on behalf of Thames Polytechnic, London, by Wiley, 1992. Analytical Chemistry by Open Learning. ISBN 978-0-471-93180-5.
- [121] WU, Naijun a Andrew M. CLAUSEN. Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, **30**(8), 1167–1182 [vid. 2021-11-22]. ISSN 16159306, 16159314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200700026

- [122] FANALI, Salvatore. *Liquid Chromatography*. Place of publication not identified: Elsevier., 2017. ISBN 978-0-12-809345-0.
- [123] CHAWLA, Gita a Chanda RANJAN. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal* [online]. 2016, **3**(1), 1–16 [vid.2021-11-22]. ISSN 1874-8422. Dostupné z: doi:10.2174/1874842201603010001
- [124] WIESE, Steffen, Terence HETZEL, Michael HEIDORN a Frank STEINER. The Modern HPLC/UHPLC Device. In: Stavros KROMIDAS, ed. *The HPLC Expert II* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017 [vid. 2021-11-22], 27–72. ISBN 978-3-527-69494-5. Dostupné z: doi:10.1002/9783527694945.ch2
- [125] FEKETE, Szabolcs, Julie SCHAPPLER, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, **63**, 2–13 [vid.2021-11-22]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.08.007
- [126] GONZÁLEZ-RUIZ, Víctor, Ana I. OLIVES a M. Antonia MARTÍN. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, **64**, 17–28 [vid. 2021-11-22]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.08.008
- [127] HAYES, Richard, Adham AHMED, Tony EDGE a Haifei ZHANG. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1357**, 36–52 [vid. 2021-11-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.05.010
- [128] FEKETE, Szabolcs, Erzsébet OLH a Jen FEKETE. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1228**, 57–71 [vid. 2021-11-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.09.050
- [129] BELL, David S. *Current State of Superficially Porous Particle Technology in Liquid Chromatography* [online]. B.m.: LCGC North America, LCGC North America-06-01-2015, **33** (6), 386–395. 1. červen 2015. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/current-state-superficially-porous-particle-technology-liquid-chromatography>
- [130] *Reasons for High Efficiency of Core-shell Column* [online]. 28. leden 2021. Dostupné z: <https://www.welch-us.com/reasons-for-high-efficiency-of-core-shell-column/>
- [131] THOMMES, Matthias, Katsumi KANEKO, Alexander V. NEIMARK, James P. OLIVIER, Francisco RODRIGUEZ-REINOSO, Jean ROUQUEROL a Kenneth S.W. SING. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied*



- Chemistry* [online]. 2015, **87**(9–10), 1051–1069 [vid. 2022-08-27]. ISSN 1365-3075, 0033-4545. Dostupné z: doi:10.1515/pac-2014-1117
- [132] SVEC, Frantisek. a Jean M. J. FRECHET. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry* [online]. 1992, **64**(7), 820–822 [vid. 2021-11-22]. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac00031a022
- [133] COLON, Luis A. Monolithic columns in liquid phase separations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, **405**(7), 2093–2094 [vid. 2021-11-22]. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6694-z
- [134] KUČEROVÁ, Barbora, Lenka KRČMOVÁ, Dagmar SOLICHOVÁ, Jiří PLÍŠEK a Petr SOLICH. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography†: Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(14), 2223–2230 [vid. 2021-11-22]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201300242
- [135] GUIOCHON, Georges. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1168**(1–2), 101–168 [vid. 2021-11-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.05.090
- [136] GUMBA, Rizo Edwin, Suryani SAALLAH, Mailin MISSON, Clarence M. ONGKUDON a Ann ANTON. Green biodiesel production: a review on feedstock, catalyst, monolithic reactor, and supercritical fluid technology. *Biofuel Research Journal* [online]. 2016, **3**(3), 431–447 [vid. 2021-11-22]. ISSN 22928782. Dostupné z: doi:10.18331/BRJ2016.3.3.3
- [137] GRUMBACH, Eric S. a Kenneth J. FOUNTAIN. *Comprehensive guide to HILIC: hydrophilic interaction chromatography*. Milford, MA: Waters, 2010. ISBN 978-1-879732-08-7.
- [138] WANG, Perry G. a Weixuan HE, ed. *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and advanced applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011. Chromatographic science series, v. 103. ISBN 978-1-4398-0753-8.
- [139] JENSEN, Pia Hønnerup, Simon MYSLING, Peter HØJRUP a Ole Nørregaard JENSEN. Glycopeptide Enrichment for MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Solid Phase Extraction (HILIC SPE). In: Jennifer J. KOHLER a Steven M. PATRIE, ed. *Mass Spectrometry of Glycoproteins* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2013 [vid. 2021-11-22], Methods in Molecular Biology, 131–144. ISBN 978-1-62703-145-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-146-2\_10
- [140] PARRIOTT, Donald, ed. *A Practical guide to HPLC detection*. San Diego: Academic Press, 1993. ISBN 978-0-12-545680-7.

- [141] FEKETE, Szabolcs, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Comparison of the most recent chromatographic approaches applied for fast and high resolution separations: Theory and practice. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, **1408**, 1–14 [vid. 2021-11-25]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.07.014
- [142] SWARTZ, Michael. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2010, **33**(9–12), 1130–1150 [vid. 2021-11-25]. ISSN 1082-6076, 1520-572X. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2010.484356
- [143] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: Celost. vysokosk. ucebnice pro vys. skoly chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 978-80-03-00569-7.
- [144] *Detection of phytochemicals in food extracts* [online]. B.m.: Groen Kennisnet. Dostupné z: <https://wiki.groenkennisnet.nl/display/CPC/4.5.+Detection+of+phytochemicals+in+food+extracts>
- [145] LINGEMAN, H., W. J. M. UNDERBERG, A. TAKADATE a A. HULSHOFF. Fluorescence Detection in High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* [online]. 1985, **8**(5), 789–874 [vid. 2021-11-25]. ISSN 0148-3919. Dostupné z: doi:10.1080/01483918508067120
- [146] KELLOGG, Mark D. Measurement of Biological Materials. In: *Clinical and Translational Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2021-11-25], 137–155. ISBN 978-0-12-802101-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802101-9.00008-9
- [147] HOFFMANN, Edmond de a Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [148] WATSON, J. Throck a O. David SPARKMAN. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. 4th ed. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-470-51634-8.
- [149] DASS, Chhabil. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007 [vid. 2021-11-25]. ISBN 978-0-470-11849-8. Dostupné z: doi:10.1002/0470118490
- [150] HAO, Chunyan, Xiaoming ZHAO a Paul YANG. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2007, **26**(6), 569–580 [vid. 2021-11-26]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2007.02.011



- [151] CROTTI, Sara, Ilena ISAK a Pietro TRALDI. Advanced spectroscopic detectors for identification and quantification: Mass spectrometry. In: *Liquid Chromatography* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2021-11-26], 431–462. ISBN 978-0-12-805393-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805393-5.00018-X
- [152] *Mass Spectrometry “Atomic particles stored in a cage without material walls”* [online]. B.m.: Humboldt-Universität zu Berlin. Dostupné z: [https://www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass\\_sp](https://www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass_sp)
- [153] COLE, J.L. Centrifugation | Analytical Ultracentrifugation. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, 2013 [vid. 2021-11-20], s. B978012409547204422X. ISBN 978-0-12-409547-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.04422-X
- [154] SCOTT, David a Arther ROWE, ed. *Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007 [vid. 2021-11-20]. ISBN 978-0-85404-547-1. Dostupné z: doi:10.1039/9781847552617
- [155] PLANKEN, Karel L. a Helmut CÖLFEN. Analytical ultracentrifugation of colloids. *Nanoscale* [online]. 2010, **2**(10), 1849 [vid. 2021-11-20]. ISSN 2040-3364, 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/c0nr00215a
- [156] LIVSHITS, Mikhail A., Elena KHOMYAKOVA, Evgeniy G. EVTUSHENKO, Vassili N. LAZAREV, Nikolay A. KULEMIN, Svetlana E. SEMINA, Edward V. GENEROZOV a Vadim M. GOVORUN. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1), 17319 [vid. 2021-11-21]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep17319
- [157] KUMAR, Parul. *Methods used for Separation of Particles in Centrifugation: 3 Methods* [online]. Dostupné z: <https://www.biologydiscussion.com/biochemistry/centrifugation/methods-used-for-separation-of-particles-in-centrifugation-3-methods/12453>
- [158] DESAI, Mohamed A. a Sandra P. MERINO. Application of Density Gradient Ultracentrifugation Using Zonal Rotors in the Large-Scale Purification of Biomolecules. In: Mohamed A. DESAI, ed. *Downstream Processing of Proteins* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2000 [vid. 2021-11-21], *Methods in Biotechnology*, s. 59–72. ISBN 978-0-89603-564-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-59259-027-8\_6
- [159] PRICE, C. A. *Centrifugation in Density Gradients*. [online]. Saint Louis: Elsevier Science, 2014 [vid. 2021-11-21]. ISBN 978-1-4832-8206-0. Dostupné z: <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1663407>

- [160] SHARPE, Paul T. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Volume 18, Volume 18*, [online]. Amsterdam; Oxford: North-Holland Pub. Co., 1988 [vid. 2021-11-17]. ISBN 9780444809278. Dostupné z: <http://site.ebrary.com/id/10239850>
- [161] GARNER, J.A. ORGANELLES | Centrifugation. In: *Encyclopedia of Separation Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2000 [vid. 2021-11-21], 3586–3596. ISBN 978-0-12-226770-3. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-226770-2/05541-1
- [162] SZCZEPIONIORSKI, Zbigniew M., Jeffrey L. WINTERS, Nicholas BANDARENKO, Haewon C. KIM, Michael L. LINENBERGER, Marisa B. MARQUES, Ravindra SARODE, Joseph SCHWARTZ, Robert WEINSTEIN a Beth H. SHAZ. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice-Evidence-based approach from the apheresis applications committee of the American Society for Apheresis. *Journal of Clinical Apheresis* [online]. 2010, **25**(3), 83–177 [vid. 2021-11-23]. ISSN 07332459. Dostupné z: doi:10.1002/jca.20240
- [163] SANCHEZ, Amber P., Robyn CUNARD a David M. WARD. The selective therapeutic apheresis procedures: The Selective Therapeutic Apheresis Procedures. *Journal of Clinical Apheresis* [online]. 2013, **28**(1), 20–29 [vid. 2021-11-23]. ISSN 07332459. Dostupné z: doi:10.1002/jca.21265
- [164] INDRÁK, Karel. *Hematologie a transfuzní lékařství*. V Praze: Triton, 2014. ISBN 978-80-7387-722-4.
- [165] ŘEHÁČEK, Vít, Jirí MASOPUST, a SPOLECNOST PRO TRANSFUZNÍ LÉKARSTVÍ CLS JEP. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4534-3.
- [166] PICKER, S. M., S. M. RADOJSKA a B. S. GATHOF. Evaluation of concurrent collection of in-line filtered platelets and packed red blood cells by multicomponent apheresis with three last-generation apparatuses. *Vox Sanguinis* [online]. 2006, **91**(1), 47–55 [vid. 2021-11-23]. ISSN 0042-9007, 1423-0410. Dostupné z: doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00774.x
- [167] ZINGSEM, Jurgen, Robert ZIMMERMANN, Volker WEISBACH, Anke GLASER, Helena BUNKENS a Reinhold ECKSTEIN. Comparison of a new WBC-reduction system and the standard plateletpheresis protocol in the same donors. *Transfusion* [online]. 2001, **41**(3), 396–400 [vid. 2021-11-23]. ISSN 0041-1132, 1537-2995. Dostupné z: doi:10.1046/j.1537-2995.2001.41030396.x
- [168] HARMENING, Denise, ed. *Modern blood banking & transfusion practices*. 6th ed. Philadelphia: F.A. Davis, 2012. ISBN 978-0-8036-2682-9.
- [169] *Apheresis Systems* [online]. B.m.: GRIFOLS. Dostupné z: <https://www.diagnostic.grifols.com/en/apheresis-systems/product-specifications>

- [170] *Trima Accel® Automated Blood Collection System* [online]. B.m.: Terumo Penpol Pvt Limited. Dostupné z: <https://www.terumopenpol.com/trima-accel-apheresis-system/>
- [171] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 978-80-246-0553-1.
- [172] KRAL, Andrej, Felix APLIN a Hannes MAIER. Advanced concepts physical chemistry: Electrodes and electrolytes. In: *Prostheses for the Brain* [online]. B.m.: Elsevier, 2021 [vid. 2021-11-26], 167–208. ISBN 978-0-12-818892-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818892-7.00014-6
- [173] BUTTON, Vera Lucia Da Silveira Nantes. Electrodes for Measurement of Dissolved Gases and Ions Concentration in the Blood Plasma. In: *Principles of Measurement and Transduction of Biomedical Variables* [online]. B.m.: Elsevier, 2015 [vid. 2021-11-26], 77–99. ISBN 978-0-12-800774-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800774-7.00003-9
- [174] SEVERINGHAUS, John W. a Poul B. ASTRUP. History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode. *Journal of Clinical Monitoring* [online]. 1986, 2(2), 125–139 [vid. 2021-11-26]. ISSN 0748-1977. Dostupné z: doi:10.1007/BF01637680
- [175] CLARK, L. C., F. GOLLAN a V. B. GUPTA. The oxygenation of blood by gas dispersion. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1950, 111(2874), 85–87. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.111.2874.85-a
- [176] CLARK, L. C. a C. LYONS. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1962, 102, 29–45. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x
- [177] PESTA, Dominik a Erich GNAIGER. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. In: Carlos M. PALMEIRA a António J. MORENO, ed. *Mitochondrial Bioenergetics* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012 [vid. 2020-11-22], Methods in Molecular Biology, 25–58. ISBN 978-1-61779-381-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-382-0\_3
- [178] DJAFARZADEH, Siamak a Stephan M. JAKOB. High-resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function in Permeabilized and Intact Cells. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2017, (120), 54985 [vid. 2021-11-26]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/54985
- [179] *Startup O2k-Respirometer* [online]. B.m.: Oroboros Instruments, GmbH. Dostupné z: <https://www.orooboros.at/index.php/product/startup-o2k-respirometer/>

- [180] GNAIGER, Erich. *The Oxygraph for High-Resolution Respirometry (HRR)* [online]. 3. prosinec 2011. Dostupné z: [https://wiki.oroboros.at/images/7/76/MiPNet06.01\\_O2k-Overview.pdf](https://wiki.oroboros.at/images/7/76/MiPNet06.01_O2k-Overview.pdf)
- [181] DYKENS, James Alan a Yvonne WILL. *Drug-induced mitochondrial dysfunction*. 2008. ISBN 978-0-470-37253-1.
- [182] GNAIGER, Erich. Mitochondrial pathways and respiratory control: An introduction to OXPHOS analysis. 5th ed. [online]. 2020 [vid. 2021-03-11]. Dostupné z: [doi:10.26124/BEC:2020-0002](https://doi.org/10.26124/BEC:2020-0002)
- [183] DOERRIER, Carolina, Luiz F. GARCIA-SOUZA, Gerhard KRUMSCHNABEL, Yvonne WOHLFARTER, András T. MÉSZÁROS a Erich GNAIGER. High-resolution fluorespirometry and OXPHOS protocols for human cells, permeabilized fibers from small biopsies of muscle, and isolated mitochondria. In: Carlos M. PALMEIRA a António J. MORENO, ed. *Mitochondrial Bioenergetics* [online]. New York, NY: Springer New York, 2018 [vid. 2021-04-12], Methods in Molecular Biology, 31–70. ISBN 978-1-4939-7830-4. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4939-7831-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_3)
- [184] GNAIGER, Erich, Barbara LASSNIG, Andrey V. KUZNETSOV a Raimund MARGREITER. Mitochondrial respiration in the low oxygen environment of the cell effect of ADP on oxygen kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 1998, **1365**(1–2), 249–254 [vid. 2021-11-26]. ISSN 00052728. Dostupné z: [doi:10.1016/S0005-2728\(98\)00076-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00076-0)
- [185] YOO, Eun-Hyung a Soo-Youn LEE. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* [online]. 2010, **10**(5), 4558–4576 [vid. 2021-11-26]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: [doi:10.3390/s100504558](https://doi.org/10.3390/s100504558)
- [186] WANG, Joseph. Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews* [online]. 2008, **108**(2), 814–825 [vid. 2021-11-26]. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: [doi:10.1021/cr068123a](https://doi.org/10.1021/cr068123a)
- [187] BRETT, Christopher M. A. a Ana Maria Oliveira BRETT. *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. Oxford ; New York: Oxford University Press, 1993. Oxford science publications. ISBN 978-0-19-855389-2.
- [188] KRONDĚÁK, Martin. *Clarkovo čidlo pro měření koncentrace rozpuštěného kyslíku* [online]. B.m.: Vesmír 89, 631. 10 2010. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2010/cislo-10/clarkovo-cidlo-pro-mereni-koncentrace-rozpusteneho-kysliku.html>
- [189] *European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2\*\** [online]. B.m.: European Medicines Agency. 7 2011. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)

- [190] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *Bioanalytical method validation guidance for industry*. [online]. B.m.: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 5 2018. Dostupné z: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
- [191] *International conference on harmonisation (ICH). Bioanalytical method validation M10 Step 2b*. [online]. B.m.: International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. 13. březen 2019. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf)
- [192] MOEIN, Mohammad Mahdi, Aziza EL BEQQALI a Mohamed ABDEL-REHIM. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of Chromatography B* [online]. 2017, **1043**, 3–11 [vid. 2022-08-14]. ISSN 15700232. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jchromb.2016.09.028](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.028)
- [193] BLIESNER, David M. *Validating chromatographic methods: a practical guide*. Hoboken, N.J: Wiley, 2006. ISBN 978-0-471-74147-3.
- [194] KRUBE, Anneli, Riin REBANE, Karin KIPPER, Maarja-Liisa OLDEKOP, Hanno EVARD, Koit HERODES, Pekka RAVIO a Ivo LEITO. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, **870**, 29–44 [vid. 2021-11-26]. ISSN 00032670. Dostupné z: [doi:10.1016/j.aca.2015.02.017](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017)
- [195] BARNETT, Kimber L., Brent HARRINGTON a Timothy W. GRAUL. Validation of liquid chromatographic methods. In: *Liquid Chromatography* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2021-11-26], 533–552. ISBN 978-0-12-805393-5. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-805393-5.00022-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00022-1)
- [196] PECHÁŇ, Ivan. Kyselina močová ako významný antioxidantný metabolit. *Klinická biochemie a metabolismus*. nedatováno, **24**(3), 207–210. ISSN 1210-7921.
- [197] MELICHAR, Bohuslav, Martina SPISAROVÁ, Marie BARTOUŠKOVÁ, Lenka Kujovská KRČMOVÁ, Lenka JAVORSKÁ a Hana ŠTUDENTOVÁ. Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. *Annals of Translational Medicine* [online]. 2017, **5**(13), 280–280 [vid. 2019-06-24]. ISSN 23055839, 23055847. Dostupné z: [doi:10.21037/atm.2017.06.29](https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.29)
- [198] SULO, Gerhard, Stein E. VOLLSET, Ottar NYGÅRD, Øivind MIDTTUN, Per Magne UELAND, Simone J.P.M. EUSSEN, Eva R. PEDERSEN a Grethe S. TELL. Neopterin and kynurenine–tryptophan ratio as predictors of coronary events in older adults, the Hordaland Health Study. *International Journal of Cardiology*

- [online]. 2013, **168**(2), 1435–1440 [vid. 2021-11-28]. ISSN 01675273. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijcard.2012.12.090
- [199] SUCHER, Robert, Katharina SCHROECKSNADEL, Guenter WEISS, Raimund MARGREITER, Dietmar FUCHS a Gerald BRANDACHER. Neopterin, a prognostic marker in human malignancies. *Cancer Letters* [online]. 2010, **287**(1), 13–22 [vid. 2019-06-24]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2009.05.008
- [200] ZHAO, Jianxing a Ying HUANG. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker for monitoring the efficacy of urate-lowering therapy in a patient with chronic gouty arthropathy. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, **450**, 115–120 [vid. 2019-06-11]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2015.08.005
- [201] OZMERIÇ, Nurdan, Terken BAYDAR, Ayşen BODUR, Ayse Basak ENGIN, Ahu URAZ, Kaya EREN a Gonul SAHIN. Level of Neopterin, a Marker of Immune Cell Activation in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and urine in Patients With Aggressive Periodontitis. *Journal of Periodontology* [online]. 2002, **73**(7), 720–725 [vid. 2019-09-30]. ISSN 0022-3492, 1943-3670. Dostupné z: doi:10.1902/jop.2002.73.7.720
- [202] PRASANNA, Jammula Surya, Chinta SUMADHURA, Parupalli KARUNAKAR a Naineni ROHINI. Comparative evaluation of salivary neopterin levels and its effects to periodontal therapy in pre- and post-menopausal women. *Journal of Menopausal Medicine* [online]. 2017, **23**(1), 32 [vid. 2019-06-24]. ISSN 2288-6478, 2288-6761. Dostupné z: doi:10.6118/jmm.2017.23.1.32
- [203] BELLADONNA, Maria Laura, Paolo PUCETTI, Ciriana ORABONA, Francesca FALLARINO, Carmine VACCA, Claudia VOLPI, Stefania GIZZI, Maria Teresa PALLOTTA, Maria Cristina FIORETTI a Ursula GROHMANN. Immunosuppression Via Tryptophan Catabolism: The Role of Kynurenine Pathway Enzymes. *Transplantation* [online]. 2007, **84**(1), S17–S20 [vid. 2022-08-28]. ISSN 0041-1337. Dostupné z: doi:10.1097/01.tp.0000269199.16209.22
- [204] MURA, P., M. BARRIERE, Y. PAPET, D. REISS, I. CAMENEN, L. VAILLANT a G. LORETTE. The Clinical Significance of Urinary Neopterin in the Follow-up of Patients after Exeresis of a Malignant Melanoma. *Pteridines* [online]. 1989, **1**(1), 19–21 [vid. 2022-07-13]. ISSN 2195-4720, 0933-4807. Dostupné z: doi:10.1515/pteridines.1989.1.1.19
- [205] MENZIES, A.M., M.T. ASHWORTH, S. SWANN, R.F. KEFFORD, K. FLAHERTY, J. WEBER, J.R. INFANTE, K.B. KIM, R. GONZALEZ, O. HAMID, L. SCHUCHTER, J. CEBON, J.A. SOSMAN, S. LITTLE, P. SUN, G. AKTAN, D. OUELLET, F. JIN, G.V. LONG a A. DAUD. Characteristics of pyrexia in BRAFV600E/K metastatic melanoma patients treated with combined dabrafenib and trametinib in a phase I/II clinical trial. *Annals of Oncology* [online]. 2015, **26**(2), 415–421 [vid. 2022-08-15]. ISSN 09237534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdu529
- [206] VERA, Jesus, Jonas PALUDO, Lisa KOTTSCHADE, Jessica BRANDT, Yiyi YAN, Matthew BLOCK, Robert MCWILLIAMS, Roxana DRONCA, Charles LOPRINZI, Axel



- GROTHEY a Svetomir N. MARKOVIC. Case series of dabrafenib-trametinib-induced pyrexia successfully treated with colchicine. *Supportive Care in Cancer* [online]. 2019, **27**(10), 3869–3875 [vid. 2022-08-15]. ISSN 0941-4355, 1433-7339. Dostupné z: doi:10.1007/s00520-019-4654-2
- [207] ZEZULOVÁ, Michaela, Marie BARTOUŠKOVÁ, Eva HLÍDKOVÁ, Tomáš ADAM, Lenka Kujovská KRČMOVÁ, Barbora ČERVINKOVÁ, Dagmar SOLICHOVÁ, Miloslava ZLEVOROVÁ, Karel CWIERTKA, David FRIEDECKÝ, David VRÁNA a Bohuslav MELICHAR. Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2016, **54**(2) [vid. 2022-07-13]. ISSN 1437-4331, 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2015-0326
- [208] ŠRÁMEK, Vlastislav, Bohuslav MELICHAR, Jarmila INDRÁKOVÁ, Hana ŠTUDENTOVÁ, Hana KALÁBOVÁ, David VRÁNA, Lucie LUKEŠOVÁ, Tomáš ADAM, Eva HLÍDKOVÁ, Jarmila JURÁŇOVÁ, Pavla PETROVÁ, Lenka Kujovská KRČMOVÁ a Dagmar SOLICHOVÁ. Risk factors of atherosclerosis in patients with history of breast cancer. *pteridines* [online]. 2013, **24**(3–4), 201–210 [vid. 2022-08-14]. ISSN 2195-4720, 0933-4807. Dostupné z: doi:10.1515/pterid-2013-0033
- [209] HVAS, Anne-Mette a Emmanuel J. FAVALORO. Platelet function analyzed by light transmission aggregometry. In: Emmanuel J. FAVALORO a Giuseppe LIPPI, ed. *Hemostasis and Thrombosis* [online]. New York, NY: Springer New York, 2017 [vid. 2020-10-29], *Methods in Molecular Biology*, 321–331. ISBN 978-1-4939-7194-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7196-1\_25
- [210] AVILA, C., R. HUANG, M. STEVENS, A. APONTE, D. TRIPODI, K. KIM a M. SACK. Platelet mitochondrial dysfunction is evident in type 2 diabetes in association with modifications of mitochondrial anti-oxidant stress proteins. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* [online]. 2012, **120**(04), 248–251 [vid. 2020-11-01]. ISSN 0947-7349, 1439-3646. Dostupné z: doi:10.1055/s-0031-1285833
- [211] BRAGANZA, Andrea, Catherine G. COREY, Adam J. SANTANASTO, Giovanna DISTEFANO, Paul M. COEN, Nancy W. GLYNN, Seyed-Mehdi NOURAIIE, Bret H. GOODPASTER, Anne B. NEWMAN a Sruti SHIVA. Platelet bioenergetics correlate with muscle energetics and are altered in older adults. *JCI Insight* [online]. 2019, **4**(13), e128248 [vid. 2021-04-12]. ISSN 2379-3708. Dostupné z: doi:10.1172/jci.insight.128248
- [212] XU, Weiling, Nayra CARDENES, Catherine COREY, Serpil C. ERZURUM a Sruti SHIVA. Platelets from asthmatic individuals show less reliance on glycolysis. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(7), e0132007 [vid. 2020-11-01]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0132007
- [213] PUSKARICH, Michael A., Jeffrey A. KLINE, John A. WATTS, Kristin SHIREY, Jonathan HOSLER a Alan E. JONES. Early alterations in platelet mitochondrial function are associated with survival and organ failure in patients with septic

- shock. *Journal of Critical Care* [online]. 2016, **31**(1), 63–67 [vid. 2020-10-29]. ISSN 08839441. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcrc.2015.10.005
- [214] FIŠAR, Zdeněk, Roman JIRÁK, Martina ZVĚŘOVÁ, Vladimír SETNIČKA, Lucie HABARTOVÁ, Jana HROUDOVÁ, Zdislava VANÍČKOVÁ a Jiří RABOCH. Plasma amyloid beta levels and platelet mitochondrial respiration in patients with Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry* [online]. 2019, **72**, 71–80 [vid. 2021-04-12]. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2019.04.003
- [215] BRAND, Martin D. a David G. NICHOLLS. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* [online]. 2011, **435**(2), 297–312 [vid. 2020-11-01]. ISSN 0264-6021, 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20110162
- [216] MAGRON, Audrey, Jonathan LAUGIER, Patrick PROVOST a Eric BOILARD. Pathogen reduction technologies: The pros and cons for platelet transfusion. *Platelets* [online]. 2018, **29**(1), 2–8 [vid. 2020-10-29]. ISSN 0953-7104, 1369-1635. Dostupné z: doi:10.1080/09537104.2017.1306046
- [217] BYNUM, James A., M. ADAM MELEDEO, Todd M. GETZ, Armando C. RODRIGUEZ, James K. ADEN, Andrew P. CAP a Heather F. PIDCOKE. Bioenergetic profiling of platelet mitochondria during storage: 4°C storage extends platelet mitochondrial function and viability. *Transfusion* [online]. 2016, **56**, S76–S84 [vid. 2020-10-29]. ISSN 00411132. Dostupné z: doi:10.1111/trf.13337
- [218] EKANEY, Michael L., Martin A. GRABLE, William F. POWERS, Iain H. MCKILLOP a Susan L. EVANS. Cytochrome c and resveratrol preserve platelet function during cold storage: *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* [online]. 2017, **83**(2), 271–277 [vid. 2020-10-29]. ISSN 2163-0755. Dostupné z: doi:10.1097/TA.0000000000001547
- [219] SUMBALOVA, Zuzana, Luiz Felipe GARCIA-SOUZA, Elisa CALABRIA, Chiara VOLANI a Erich GNAIGER. O2k-Protocols: Isolation of peripheral blood mononuclear cells and platelets from human blood for HRFR. *Mitochondr Physiol Network* [online]. 2020, **21.17**(04), 1–15. Dostupné z: [https://wiki.oroboros.at/images/a/af/MiPNet21.17\\_BloodCellsIsolation.pdf](https://wiki.oroboros.at/images/a/af/MiPNet21.17_BloodCellsIsolation.pdf)
- [220] CHANCE, B. a G. R. WILLIAMS. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *The Journal of Biological Chemistry*. 1955, **217**(1), 383–393. ISSN 0021-9258.



## 7. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ

### 7.1 Výstupy s disertační prací související

#### 1. Non-invasive determination of uric acid in human saliva in diagnosis of serious disorders

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Bohuslav Melichar, František Švec  
*Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2020, 59(5), 797–812

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 8,490; podle IF: Q1

Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 1,205; podle AIS: Q1

Podíl autorky: rešerše literatury zabývající se stanovením kyseliny močové ve slinách u diagnostiky různých chorob v klinickém výzkumu, příprava a revize publikace

#### 2. Chromatographic method for determination of inflammatory biomarkers and uric acid in human saliva

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová, Ondřej Strouhal, Adam Kašparovský, Bohuslav Melichar, František Švec  
*Talanta*, 2021, 233, 122598

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 6,556; podle IF: Q1

Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,764; podle AIS: Q1

Podíl autorky: experimentální práce (optimalizace a validace HPLC metody), zpracování dat, příprava a revize publikace

#### 3. Mitochondrial respiration of platelets: comparison of isolation methods

Andrea Vernerová, Luiz Felipe Garcia-Souza, Ondřej Souček, Milan Košťál, Vít Řeháček, Lenka Kujovská Krčmová, Erich Gnaiger, Ondřej Sobotka  
*Biomedicines*, 2021, 9 (12), 1859

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 4,757; podle IF: Q2/Q2/Q2

Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,798; podle AIS: Q2

Podíl autorky: experimentální práce (izolace trombocytů a optimalizace a analýza mitochondriální respirace), zpracování dat, příprava a revize publikace

**4. Liquid chromatography method with tandem mass spectrometry and fluorescence detection for determination of inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid as a tool for diagnosis of periodontal disease**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová, František Švec

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 212, 114644

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 3,571; podle IF: Q2/Q3

Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,515; podle AIS: Q2

Podíl autorky: experimentální práce (optimalizace a validace HPLC metody), zpracování dat, příprava a revize publikace

**5. Potential utilization of neopterin measurements in the assessment of pyrexia in metastatic melanoma treated with combined targeted therapy: a case report**

Marie Bartoušková, Michaela Hrousková, Filip Čtvrtlík, Eva Hlídková, Kateřina Kučerová, Andrea Vernerová, Bohuslav Melichar, Hana Študentová

*Pteridines*, 2022, 31 (1), 151–157

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 0,659; podle IF: Q4/Q4

Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,112; podle AIS: Q4

Podíl autorky: experimentální práce provedené na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky ve FN Hradec Králové (úprava a analýza poskytnutých vzorků z FN Olomouc) a zpracování získaných dat, revize publikace

## **7.2 Výstupy s disertační prací nesouvisející**

**6. Imatinib-induced changes in the expression profile of microRNA in the plasma and heart of mice—A comparison with doxorubicin**

Barbora Hanousková, Mikuláš Skála, Veronika Brynychová, Tomáš Zárybnický, Veronika Skarková, Petra Kazimírová, Andrea Vernerová, Pavel Souček, Lenka Skálová, Radek Pudil, Petra Matoušková

*Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 115, 108883

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 7,419; podle IF: Q1/Q1

Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,905; podle AIS: Q1

Podíl autorky: experimentální práce provedené na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové (izolace a analýza mikroRNA) a zpracování získaných dat, revize publikace

**7. Neopterin, kynurenine and tryptophan levels as markers of inflammatory response in periodontitis**

Ondřej Heneberk, Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Eliška Wurfelová, Vladimíra Radochová

*Journal of Applied Oral Science, 2022, v recenzním řízení*

Impakt faktor<sub>2021</sub> (IF): 3,144; podle IF: Q2

Article Influence Score<sub>2021</sub> (AIS): 0,656; podle AIS: Q2

Podíl autorky: experimentální práce provedené na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky ve FN Hradec Králové (úprava a analýza poskytnutých vzorků ze Stomatologické kliniky FN Hradec Králové) a zpracování získaných dat, revize publikace



## 8. PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ

### 8.1 Přednášky

**1. Determination of important biomarkers during treatment with rheohemapheresis in age-related dry form of macular degeneration**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Milan Bláha

*9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference; Hradec Králové, Česká republika; 23.–24.1.2019*

**2. Saliva as a potential diagnostic fluid for determination of immune system activation markers, creatinine and uric acid**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová

*71. Zjazd chemikov (Ceny SHIMADZU); Starý Smokovec, Vysoké Tatry, Slovensko;*

*9.–13.9.2019*

**3. Mitochondrial analysis of human platelets: Comparison of differential centrifugation and continuous flow apheresis**

Andrea Vernerová, Luiz Felipe Garcia-Souza, Erich Gnaiger, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Sobotka

*10. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference; Hradec Králové, Česká republika; 22.–23.1.2020*

**4. HPLC-FLD/DAD determination of salivary immune system activation markers, uric acid and creatinine in clinical research**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová

*11. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference; online; 27.–28.1.2020*

**5. Mitochondrial analysis of human platelets: Comparison of density gradient centrifugation and platelet apheresis**

Andrea Vernerová, Luiz Felipe Garcia-Souza, Erich Gnaiger, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Sobotka

*XX. Interdisciplinary meeting of young life scientists; online; 16.–19.5.2021*

**6. UHPLC-MS/MS method for determination of inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová  
*17th International Students Conference 'Modern Analytical Chemistry'; Praha, Česká republika; 16.–17.9.2021*

**7. Neopterin, kynurenine, and tryptophane levels as markers of inflammatory response in periodontitis**

Ondřej Heneberk, Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Vladimíra Radochová  
*Konference studentů doktorských studijních programů; 25.10.2021*

**8. Application of UHPLC-MS/MS method for determination of inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová  
*12. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference; Hradec Králové, Česká republika; 1.–2.2.2022*

**9. Neopterin, kynurenin, tryptofan jako markery aktivace imunitního systému u parodontitidy**

Ondřej Heneberk, Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Vladimíra Radochová  
*Úsměv 22, Olomouc, Česká republika; 25.03.2022*

**10. Neopterin, kynurenin, tryptofan jako markery aktivace imunitního systému u parodontitidy**

Ondřej Heneberk, Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Vladimíra Radochová  
*Den výzkumných prací 2022, Praha, Česká republika; 03.06.2022*

## 8.2 Plakátová sdělení

### 1. HPLC method for determination of immune system activation markers, creatinine and uric acid in human saliva-part I

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová

*24th International Symposium on Separation Science (ISSS 2018), Jasná, Slovensko; 16.–20.6.2018*

### 2. UHPLC-MS/MS determination of biological markers in oncological research

Kateřina Kučerová, Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ludmila Matysová

*19. Škola hmotnostní spektrometrie; Špindlerův Mlýn, Česká republika; 10.–14.9.2018*

### 3. Determination of immune system activation markers, uric acid and creatinine in human saliva using HPLC

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová

*48th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2019); Milán, Itálie; 16.–20.6.2019*

### 4. Mitochondrial functional and metabolic analysis of human platelets

Andrea Vernerová, Luiz Felipe Garcia-Souza, Erich Gnaiger, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Sobotka

*XXXVI. Mezinárodní kongres SKVIMP 2021; Hradec Králové, Česká republika; 10.–12.2021*

### 5. Determination of inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid as a tool for diagnosis of periodontal disease

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová

*Česká chromatografická škola - HPLC.cz 2021; Zaječí, Česká republika; 19.–22.9.2021*

## **6. Chromatographic method for determination of inflammatory biomarkers as a tool for diagnosis of periodontitis**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová  
*48th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2022); San Diego, Spojené státy americké;*  
18.–23.6.2022

## **7. Sample preparation in clinical practice – feasibility and challenges of microextraction techniques**

Kateřina Matoušová, Kristýna Mrštná, Lenka Javorská, Dorota Turoňová,  
Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová  
*48th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2022); San Diego, Spojené státy americké;*  
18.–23.6.2022

## **8.3 Grantové projekty**

### **1. Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK) 814316 (2016–2018)**

Detekce velmi časných projevů kardiotoxicity chemoterapie s využitím pokročilých echokardiografických technik, proteinových kardiomarkerů a cirkulujících mikroRNA  
členka řešitelského kolektivu

### **2. Grant Interní soutěže FN v Hradci Králové 81-44 (2018)**

Stanovení markerů aktivity imunitního systému a kyseliny močové ve slinách u pacientů s orální mukosítidou jako častým nežádoucím účinkem léčby u vybraných malignit  
členka řešitelského kolektivu

### **3. Grant Interní soutěže FN v Hradci Králové 81-42 (2020)**

Porovnání mitochondriální respirace trombocytů izolovaných pomocí dvou metod: diferenční centrifugace a kontinuálního odběru na separátoru  
členka řešitelského kolektivu



**4. Grant Interní soutěže FN v Hradci Králové 81-28 (2021)**

Mitochondriální respirace a poměr hladin kynureninu/tryptofanu u pacientů s glioblastomem

členka řešitelského kolektivu

**5. Grant Ministerstva zdravotnictví ČR NV 18-03-00130 (2018–2022)**

Studium specifických faktorů ovlivňujících toxicitu hypertermické intraperitoneální chemoterapie

členka řešitelského kolektivu

**8.4 Stáže**

2020           Zahraniční stáž v DSL-Oroboros Research Laboratory: Medical University of Innsbruck, Rakousko; Department of Visceral, Transplant and Thoracic Surgery, Innsbruck, Rakousko (**3 měsíce**, projekt AKTION)



## 9. PŘÍLOHY

### 9.1 Příloha 1

**Non-invasive determination of uric acid in human saliva in diagnosis of serious disorders**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Bohuslav Melichar, František Švec  
*Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2020, 59 (5), 797–812

### 9.2 Příloha 2

**Chromatographic method for determination of inflammatory biomarkers and uric acid in human saliva**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová, Ondřej Strouhal, Adam Kašparovský, Bohuslav Melichar, František Švec  
*Talanta*, 2021, 233, 122598

### 9.3 Příloha 3

**UHPLC method for determination of inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid as a tool for diagnosis of periodontal disease**

Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmová, Ondřej Heneberk, Vladimíra Radochová, František Švec  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 212, 114644

### 9.4 Příloha 4

**Potential utilization of neopterin measurements in the assessment of pyrexia in metastatic melanoma treated with combined targeted therapy: a case report**

Marie Bartoušková, Michaela Hrousková, Filip Čtvrtlík, Eva Hlídková, Kateřina Kučerová, Andrea Vernerová, Bohuslav Melichar, Hana Študentová  
*Pteridines*, 2020, 31 (1), 151–157

## 9.5 Příloha 5

### **Mitochondrial respiration of platelets: comparison of isolation methods**

Andrea Vernerová, Luiz Felipe Garcia-Souza, Ondřej Souček, Milan Košťál, Vít Řeháček, Lenka Kujovská Krčmova, Erich Gnaiger, Ondřej Sobotka

*Biomedicines*, 2021, 9 (12), 1859

## 9.6 Příloha 6

### **Imatinib-induced changes in the expression profile of microRNA in the plasma and heart of mice—A comparison with doxorubicin**

Barbora Hanousková, Mikuláš Skála, Veronika Brynychová, Tomáš Zárybnický, Veronika Skarková, Petra Kazimírová, Andrea Vernerová, Pavel Souček, Lenka Skálová, Radek Pudil, Petra Matoušková

*Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 115, 108883

## 9.7 Příloha 7

### **Neopterin, kynurenine and tryptophan levels as markers of inflammatory response in periodontitis**

Ondřej Heneberk, Andrea Vernerová, Lenka Kujovská Krčmova, Eliška Wurfelová, Vladimíra Radochová

*Journal of Applied Oral Science*, 2022, v recenzním řízení